

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

**ALTERACIONES MICROANATÓMICAS DE LAS DENDRITAS DE LAS  
NEURONAS DE PROYECCIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**PAULA MERINO SERRAIS**

Tesis Doctoral 2011



**Universidad Autónoma de Madrid**

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**ALTERACIONES MICROANATÓMICAS DE LAS  
DENDRITAS DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia presentada por

**PAULA MERINO SERRAIS**

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección del  
Prof. Javier DeFelipe Oroquieta y de la Dra. Shira Knafo

VºBº de los directores de la Tesis

Fdo. Prof. Javier de Felipe Oroquieta

Fdo. Dra. Shira Knafo

VºBº de la tutora

La interesada

Fdo. Dra. Lucía Prensa Sepúlveda

Fdo. Paula Merino Serrais





El Dr. Javier de Felipe Oroquieta, profesor de investigación del Instituto Cajal del CSIC y la Dra. Shira Knafo, investigadora contratada Ramón y Cajal del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" del CSIC

HACEN CONSTAR:

Que Paula Merino Serrais ha realizado bajo su dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "ALTERACIONES MICROANATÓMICAS DE LAS DENDRITAS DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER" que ha llevado a cabo con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firman en Madrid a 18 de marzo de 2011,

Fdo. Prof. Javier de Felipe Oroquieta

Fdo. Dra. Shira Knafo



## ÍNDICE



---

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Enfermedad de Alzheimer .....	3
1.1.1 Definición.....	3
1.1.2 Historia.....	3
1.1.3 Sintomatología.....	5
1.1.4 Alzheimer familiar y Alzheimer esporádico.....	5
1.1.4.1. Genes implicados en el Alzheimer familiar.....	6
1.1.4.1.1 Gen de la proteína precursora del amiloide (APP).....	6
1.1.4.1.2 Gen de la Presenilina 1 (PS1) y de la Presenilina 2 (PS2).....	7
1.1.4.2 Genes implicados en el Alzheimer esporádico.....	8
1.1.4.2.1 Gen de la Apolipoproteína E.....	8
1.1.4.2.2 Genes que incrementan la susceptibilidad de padecer Alzheimer esporádico.....	8
1.1.4.3 Factores de riesgo no genéticos.....	9
1.1.4.3.1 Envejecimiento.....	9
1.1.4.3.2 Estrés oxidativo.....	9
1.1.4.3.3 Otros factores.....	9
1.1.5 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer.....	10
1.1.5.1 Péptido amiloide.....	10
1.1.5.1.1 Proteína precursora del péptido amiloide (APP).....	10
1.1.5.1.2 Vía no amiloidogénica.....	11
1.1.5.1.3 Vía amiloidogénica: síntesis del péptido $\beta$ -amiloide.....	12
1.1.5.1.4 Formas del péptido A $\beta$ y su implicación en la enfermedad de Alzheimer.....	12
1.1.5.1.4.1 Oligómeros.....	13
1.1.5.1.4.2 Placas seniles.....	13
1.1.5.2 Proteína Tau.....	14
1.1.5.2.1 Formas de la proteína tau hiperfosforilada y su implicación en la enfermedad de Alzheimer.....	14
1.1.5.3 Progresión de la Enfermedad de Alzheimer.....	15
1.1.5.4 Hipótesis de la cascada de amiloide.....	16
1.1.5.5 Pérdida sináptica y neuronal.....	16
1.1.6 Modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	17
1.1.6.1 Modelo APP/PS1.....	17
1.2 Corteza cerebral.....	18
1.2.1 Formación del hipocampo.....	18
1.2.1.1 Definición.....	18
1.2.1.2 Estructura.....	18
1.2.1.3 Giro dentado.....	19
1.2.1.4 Hipocampo propio.....	19
1.2.1.5 Conexiones de la formación del hipocampo.....	22
1.2.2 Corteza parahipocampal.....	22
1.2.2.1 Estructura y función.....	22
1.2.3 Amígdala lateral.....	23
1.2.3.1 Estructura y función.....	23
1.2.4 Sistema Límbico.....	24
1.2.5 Tipos de neuronas.....	25
1.2.5.1 Neuronas de proyección.....	25
1.2.5.1.1 Células piramidales de la CPH.....	25
1.2.5.1.2 Células piramidales de CA1.....	26
1.2.5.1.3 Células granulares del GD.....	26
1.2.5.1.4 Células de proyección de la AL.....	26
1.2.5.2 Interneuronas.....	27
1.2.6 Espinas dendríticas.....	28
1.2.6.1 Antecedentes históricos.....	28
1.2.6.2 Morfología y función.....	28
1.2.6.3 Espinas dendríticas en estados patológicos.....	30
1.2.6.4 Espinas dendríticas en la enfermedad de Alzheimer.....	30

---

---

II. OBJETIVOS.....	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
3.1. Material.....	41
3.1.1 Estudios de comportamiento.....	41
3.1.1.1 Animales.....	41
3.1.1.2 Laberinto en cruz elevado.....	41
3.1.1.3 Condicionamiento al miedo mediante estímulos auditivos (CMA).....	41
3.1.1.4 Umbral de dolor.....	41
3.1.2 Tejido procedente del modelo murino transgénico APP/PS1.....	41
3.1.3 Tejido humano para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.....	42
3.2 Métodos.....	42
3.2.1 Tinción con el método de Nissl.....	42
3.2.2 Inyecciones intracelulares.....	43
3.2.2.1 Modelo APP/PS1.....	43
3.2.2.2 Materia humano.....	43
3.2.3 Inmunocitoquímica.....	44
3.2.3.1 Marcaje simple.....	44
3.2.3.1.1 Placas $\beta$ -amiloide.....	44
3.2.3.1.2 Neuronas inmunoreactivas para PHF-tau.....	46
3.2.3.1.3 Marcaje de neuronas.....	46
3.2.3.2 Marcaje doble.....	47
3.2.3.3 Marcaje triple.....	47
3.2.4 Análisis cuantitativo.....	47
3.2.4.1 Procedimiento estereológico: Estimación del volumen ocupado por las placas.....	47
3.2.4.2 Procedimiento estereológico: Estimación del porcentaje de neuronas PHF-tau <sub>AT8</sub> <sup>-</sup> y PHF-tau <sub>PHF1</sub> -ir.....	48
3.2.4.3 Procedimiento estereológico: Estimación del porcentaje de neuronas Nue-N-ir.....	48
3.2.5 Estudio morfométrico de las neuronas inyectadas: Reconstrucción y análisis.....	49
3.2.5.1 Modelo APP/PS1.....	49
3.2.5.2 Tejido humano.....	50
3.2.6 Análisis estadístico.....	51
3.2.6.1 Ratón APP/PS1.....	51
3.2.6.2 Tejido humano.....	51
IV. RESULTADOS.....	53
4.1 Patología amiloide.....	55
4.1.1 Amígdala lateral.....	55
4.1.1.1 Estudios de comportamiento.....	55
4.1.1.1.1 Laberinto en cruz elevado.....	55
4.1.1.1.2 Miedo condicionado mediante estímulos auditivos.....	55
4.1.1.1.3 Umbral de dolor.....	55
4.1.1.2 Volumen ocupado por las placas.....	56
4.1.1.3 Densidad neuronal en AL.....	56
4.1.1.4 Alteraciones en la complejidad del árbol dendrítico.....	56
4.1.1.5 Diámetro y densidad dendrítica.....	56
4.1.1.6 Alteraciones morfológicas de las espinas.....	58
4.1.2 Giro dentado.....	58
4.1.2.1 Volumen ocupado por las placas.....	58
4.1.2.2 Alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas.....	60
4.1.2.3 Alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas.....	62
4.1.3 CA1.....	63
4.1.3.1 Volumen ocupado por las placas.....	63
4.1.3.2 Densidad y morfología de las espinas dendríticas.....	63
4.1.3.2.1 <i>Stratum oriens</i> .....	63
4.1.3.2.2 <i>Stratum radiatum</i> .....	64
4.2 Patología neurofibrilar.....	68
4.2.1 Volumen ocupado por las placas.....	68

---

---

4.2.2 Porcentaje de neuronas PHF-tau-ir.....	68
4.2.3 Análisis morfológico de las neuronas inyectadas con LY.....	68
4.2.3.1 Consideraciones metodológicas.....	68
4.2.3.2 Análisis morfométrico en CPH.....	70
4.2.3.3 Análisis morfométrico en CA1.....	75
4.2.3.4 Otras alteraciones morfológicas.....	80
V. DISCUSIÓN.....	83
5.1 Neuropatología amiloide.....	85
5.1.1 Amígdala lateral.....	85
5.1.2 Giro dentado.....	88
5.1.3 CA1.....	90
5.2 Neuropatología fibrilar.....	92
5.3 Deterioro cognitivo en pacientes con enfermedad de Alzheimer: $\beta$ -amiloide vs. PHF-tau.....	96
VI. CONCLUSIONES.....	99
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	103
VIII. ANEXO.....	117

---





**ADAM:** familia de las integrinas y metaloproteínas.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AICD:** dominio intracelular del APP.

**AL:** amígdala lateral.

**AMPA:** receptor ionotrópico de glutamato, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

**ApoE:** Apolipoproteína E.

**APP:** proteína precursora del péptido amiloide.

**APP-C83:** secuencia de 83 residuos aminoacídicos junto al extremo carboxi-terminal del APP.

**APP/PS1:** modelo murino transgénico que expresa APP (APP<sup>swe</sup>) y PS1 (PS1-dE9).

**APP-99:** secuencia de 99 residuos aminoacídicos del APP.

**A $\beta$ :** péptido  $\beta$ -amiloide.

**BACE:** enzima de corte de APP en el dominio  $\beta$ .

**BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro.

**CA1:** cuerpo amónico 1.

**CA2:** cuerpo amónico 2.

**CA3:** cuerpo amónico 3.

**CA4:** cuerpo amónico 4.

**Ca<sup>++</sup>:** ión calcio.

**CCVDs:** canales de calcio voltaje-dependientes tipo-R.

**CMA:** test de condicionamiento al miedo mediante estímulos auditivos.

**CMI:** capa molecular interna del GD.

**CMM/CME:** capa molecular intermedia/externa del GD.

**CP:** segmentos de dendritas en contacto con placas; cuando una parte de la dendrita se encuentra localizada entre el borde de la placa y 0,2  $\mu$ m hacia el interior de la misma, y las espinas pertenecientes a ellos.

**CPH:** corteza parahipocampal.

**C-31:** fragmento neurotóxico de APP.

**DAB:** cromógeno 3, 3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina.

**DPX:** mezcla de isómeros para medio de montaje.

**EA:** enfermedad de Alzheimer.

**EAE:** enfermedad de Alzheimer esporádica.

**EAF:** enfermedad de Alzheimer familiar.

**EEC:** Directiva Comunitaria Europea sobre animales de experimentación.

**FTDP-17:** demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17.

**GD:** giro dentado.

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad.

**LDL:** lipoproteínas de densidad intermedia.

**LTD:** depresión duradera.

**LTP:** potenciación duradera.

**LP:** dendritas que no están en contacto con las placas y las espinas pertenecientes a ellas.

**LY:** Lucifer Yellow.

**MAPs:** proteínas asociadas a microtúbulos.

**NeuN:** proteína específica nuclear de neurona.

**NF:** ovillos neurofibrilares.

**NTg-:** neuronas controles.

**NLP:** neuronas libres de placas.

**NTP:** neuronas que tienen al menos una dendrita en contacto con placa.

**PB:** tampón fosfato 0,1M, pH= 7,4.

**PHF-tau:** tau hiperfosforilada formando filamentos pareados helicoidales.

**PP:** segmentos de dendritas que pasan por dentro de una placa y las espinas pertenecientes a ellos.

**PSD:** densidad postsináptica.

**PS1:** presenilina 1.

**PS2:** presenilina 2.

---

## Lista de abreviaturas

---

**RE:** retículo endoplasmático.

**Ser:** serina.

**Tg-:** control.

**Thr:** treonina.

**TP:** dendritas que están tocando una placa, sin el segmento que contacta con la placa y las espinas pertenecientes a ellas.

**Tris-HCl:** tampón tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreuro.

**VAHP:** vesículas adyacentes a la hendidura postsináptica.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

---

## **I. INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedad de Alzheimer

#### 1.1.1 Definición

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia asociada al envejecimiento (Morishima-Kawashima y Ihara, 2002). Se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que no sólo afecta a la pérdida de las funciones de memoria, orientación y lenguaje, sino también a otros componentes funcionales más complejos, tales como la personalidad, el raciocinio o la resolución de problemas (Jucker *et al.*, 2006). En los estadios más avanzados, la dependencia mental y física del enfermo es absoluta, y puesto que esta enfermedad representa entre el 50% y el 75% de los casos de demencia senil, tiene unos costes sociales y económicos muy importantes (Wimo *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, la edad de aparición es a partir de los 65 años. Según la Fundación Alzheimer España (FAE), se encuentran afectados entre el 5-7 % de la población mayor de 65 años y este porcentaje aumenta alcanzando el 25% en personas mayores de 85 años. Cerca de 650.000 personas están afectadas en España y se diagnostican 100.000 nuevos casos al año. Se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y se triplique en 2050.

Los cambios neuropatológicos de la EA son distintivos, pero la correlación con diversos aspectos clínicos no está claramente determinada. A nivel macroscópico se observa una notable atrofia en la formación del hipocampo y en diversas áreas de la neocorteza. A nivel microscópico se encuentra una serie de alteraciones en la formación del hipocampo, neocorteza y distintas regiones subcorticales. Las principales características histopatológicas son la presencia de **placas seniles** (formadas por acumulaciones extracelulares del péptido

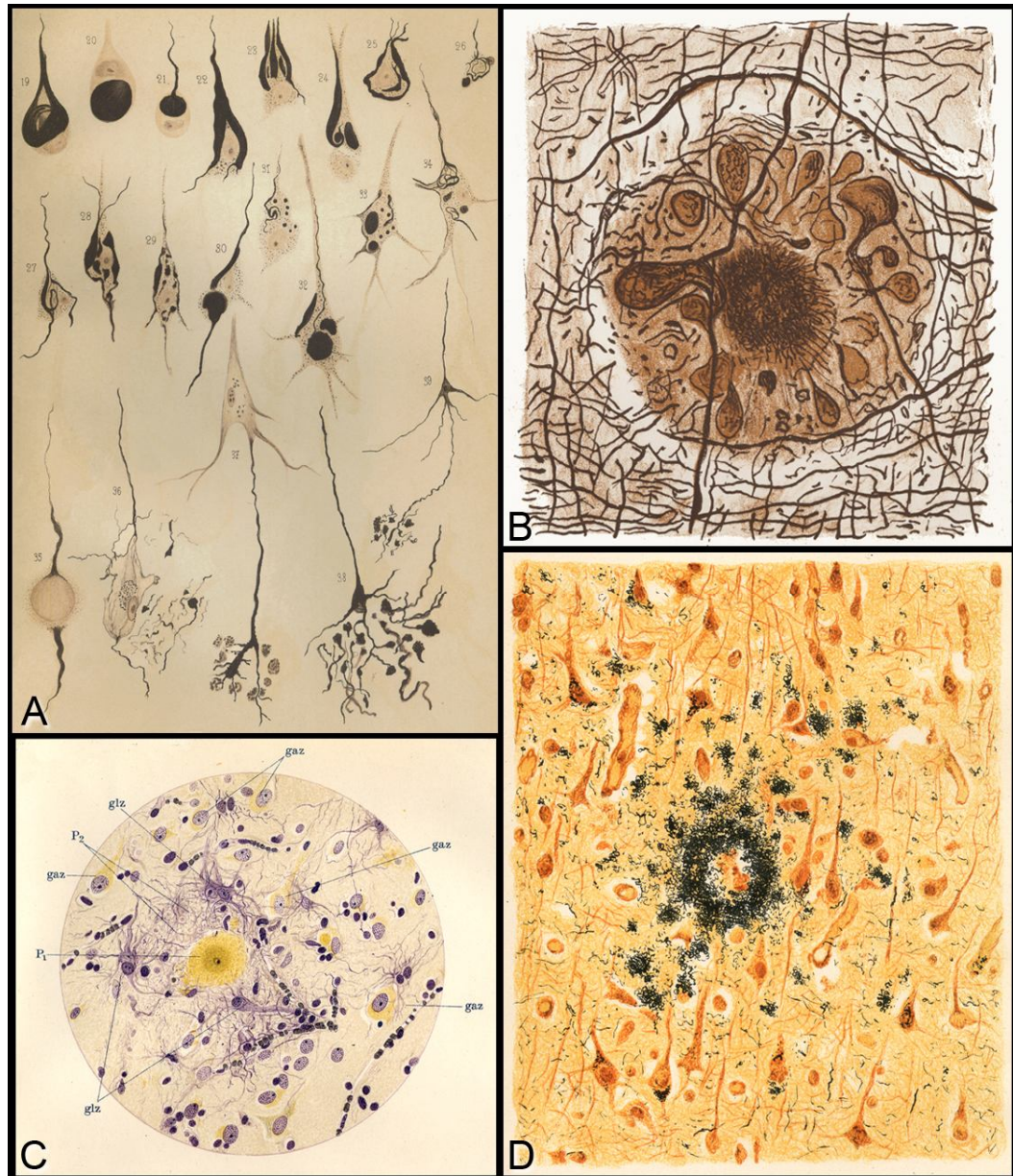
$\beta$ -amiloide y de prolongaciones dendríticas y axónicas degeneradas o en fase de degeneración y prolongaciones gliales alteradas) y **ovillos neurofibrilares intracelulares** (agregados de la proteína tau anormalmente hiperfosforilada) (Figura 1).

#### 1.1.2 Historia

La EA fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer (1864-1915), psiquiatra y anatomopatólogo alemán (Figura 2). El 3 de noviembre de 1906 Alzheimer presentó una comunicación en la "XXXVII *Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte*" (37º Encuentro de Psiquiatría del Suroeste Alemán) (Tübingen) titulada "Sobre una enfermedad característica de la corteza cerebral", en la cual describió el caso clínico de Agustine D, una mujer de 51 años que presentaba un cuadro grave de demencia y que falleció a los 55 años de edad. Además, describió los cambios histopatológicos que aparecían en su cerebro ("la corteza cerebral era anormalmente estrecha y existían placas seniles y ovillos neurofibrilares"). Fue en 1907 cuando finalmente Alzheimer publicó los resultados en forma de artículo "Sobre una enfermedad específica de la corteza cerebral", donde describió más detalladamente este caso (Alzheimer, 1907).

En 1910 su colega Emil Kraepelin introdujo el término *Enfermedad de Alzheimer* para designar este cuadro clínico. Años más tarde, el término de Enfermedad de Alzheimer (EA) ya estaba establecido y era utilizado por la comunidad científica, incluyendo a Cajal, quien utilizó este término en diversos trabajos publicados en la década de 1920 (revisado en García-Marin *et al.*, 2007; Figura 3).

En 1911, Alois Alzheimer publicó un trabajo donde describió su segundo caso: la historia clínica de Johann F, varón de 57 años que murió en octubre de 1910, tras más



**Figura 1.** (A) Dibujos de ovillos neurofibrilares teñidos con en método de impregnación de plata realizados por Sala (1913). (B-D) Dibujos de placas seniles de Marinesco y Minea (1912), Alzheimer (1911) y Cowe (1915), respectivamente, usando diferentes técnicas. Tomado de DeFelipe, 2009.

de 3 años de internamiento en una clínica debido a su elevado grado de demencia. El estudio *post mortem* reveló numerosas placas neuríticas, pero ningún ovillo neurofibrilar en la corteza cerebral. Se refirió a ella como demencia de tipo "solo placas". La buena conservación de las muestras utilizadas por Alzheimer, permitió en 1997 realizar estudios genéticos que demostraron que Johann F era homocigoto para el alelo de la apolipo-

proteína E3 y presentaba mutaciones en los codones 692, 693, 713 y 717 de la proteína precursora del péptido amiloide (APP) (Graever *et al.*, 1997). Aunque la enfermedad fue descrita hace más de un siglo, no fue hasta la década de los setenta cuando los casos descritos por Alzheimer empezaron a cobrar interés, debido a que al aumentar la esperanza de vida hubo un aumento espectacular de pacientes con esta enferme-



**Figura 2.** Fotografía de Alois Alzheimer (1864-1915).

dad. Hoy en día se sabe que es una demencia de carácter progresivo e irreversible, que sus causas son desconocidas y actualmente no existe ningún tipo de tratamiento para prevenirla o evitar su progresión.

### 1.1.3 Sintomatología

Los enfermos de EA viven un promedio de ocho años tras el diagnóstico de la enfermedad. En algunos casos este periodo se alarga hasta veinte años. Al principio aparecen pequeñas pérdidas de memoria que se van haciendo más notorias con el paso del tiempo hasta que el enfermo queda incapacitado para realizar tareas cotidianas y simples, así como otras más intelectuales. Los síntomas se dividen en tres etapas cuyo desarrollo varía de una persona a otra:

**-Etapa inicial o leve:** al principio, la enfermedad puede pasar desapercibida. Aparecen pequeñas pérdidas de memoria (dificultad para recordar conversaciones o hechos recientes) y vocabulario. Apatía general, alejamiento de las relaciones sociales,

cambios de humor y ciertos rasgos depresivos. Reducción de la capacidad de juicio y resolución de nuevas situaciones.

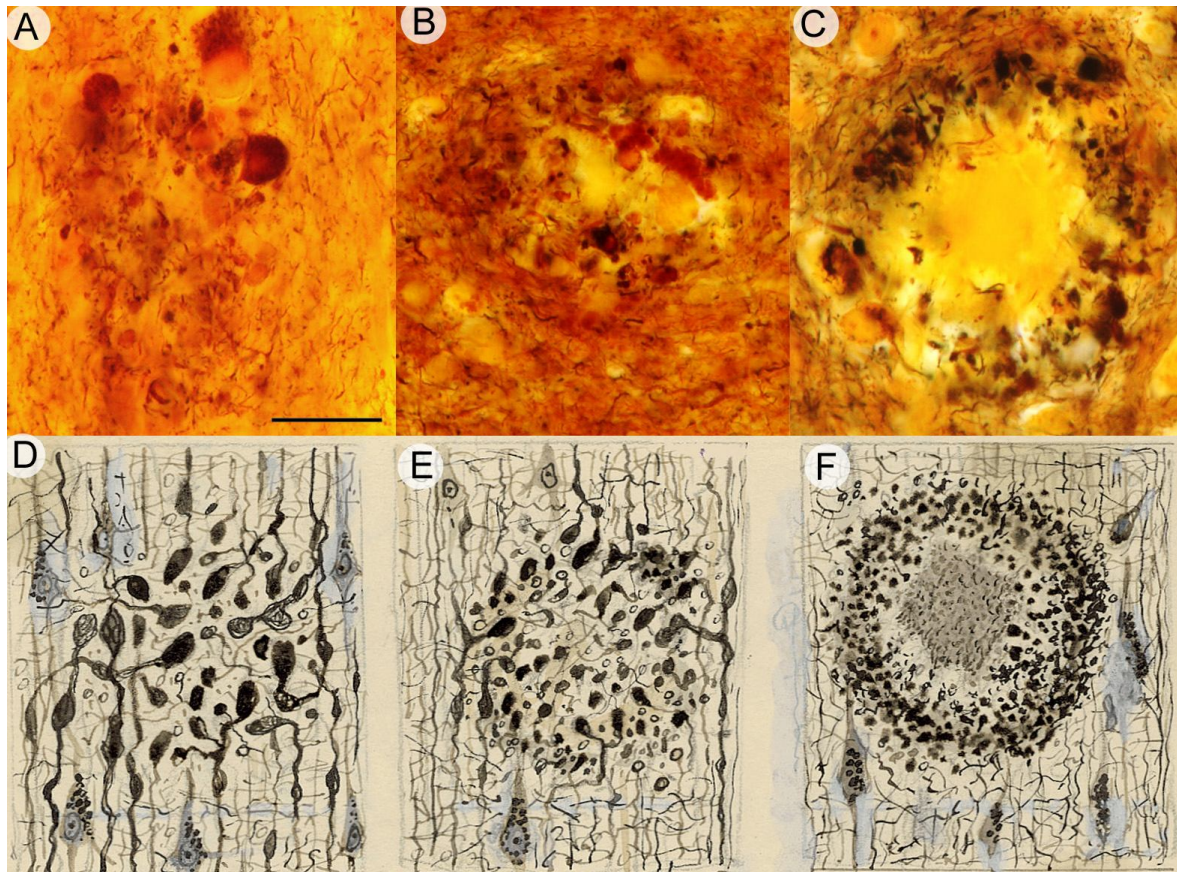
**-Etapa intermedia o moderada:** la enfermedad resulta evidente. Aparecen problemas conductuales (ira, paranoia, violencia, alucinaciones, repetición en preguntas y frases, problemas para comer). Pérdida de la capacidad de razonamiento, comprensión y coordinación. Se encuentran visiblemente apáticos y deprimidos. El deterioro avanza con rapidez y los enfermos pueden llegar a perderse en lugares familiares y no reconocer a familiares o amigos.

**-Etapa avanzada o grave:** todas las funciones cognitivas se encuentran afectadas. Pierden la capacidad de comunicación, o repiten frases inconexas una y otra vez. Presentan una incapacidad para reconocer a sus familiares y amigos; ni siquiera se reconocen a ellos mismos ante un espejo. Los enfermos se muestran desorientados y los más afectados se olvidan de andar, sentarse, y sufren incontinencia. Se olvidan de hechos recientes y lejanos. Permanecen horas inmóviles sin actividad y durmiendo. Dejan de ser individuos autónomos y necesitan de ayuda constante. Gritan, lloran o ríen sin motivo y no comprenden cuando se les habla. Pueden llegar a sufrir rigidez, convulsiones y trastornos deglutorios. Muchos de ellos acaban en estado vegetativo.

### 1.1.4 Alzheimer familiar y Alzheimer esporádico

La enfermedad de Alzheimer familiar (EAF) o de inicio temprano, constituye únicamente el 5% de los casos diagnosticados de Alzheimer, siendo el Alzheimer esporádico (EAE) o de inicio tardío el que se presenta en la gran mayoría de los casos. Se denomina Alzheimer familiar o de inicio precoz porque es hereditario y la edad de aparición es temprana, a partir de los 40 años





**Figura 3.** (A-C) Estadios en la formación de una placa senil clásica tomados de una preparación histológica original de Cajal de la corteza cerebral teñida con el método del nitrato de plata reducido y (D-E) representados con dibujos originales de Cajal. Tomado de Garcia-Marin *et al.*, 2007.

(Rosemberg, 2000). Mientras que el Alzheimer de tipo esporádico o de inicio tardío no está sujeto a herencia y su edad de aparición está en torno de los 65 años. Ambos tipos de EA comparten el mismo patrón anatomopatológico (presencia de placas seniles y de ovillos neurofibrilares) y síntomas clínicos.

#### 1.1.4.1 Genes implicados en el Alzheimer familiar

Actualmente se conocen tres genes implicados en la EAF. Siguen un patrón de herencia mendeliana y de transmisión autosómica dominante.

##### 1.1.4.1.1 Gen de la proteína precursora del amiloide (APP)

Se encuentra localizado en el cromosoma 21 (21q21.3). Este gen codifica para un receptor de la superficie celular y para una

proteína precursora transmembrana que es cortada por distintas secretasas formando distintos péptidos. Algunos de estos péptidos son secretados al medio y pueden unirse al complejo acetiltransferasa APBB1/TIP60, promoviendo una activación transcripcional, mientras que otras formas de esta proteína ( $\beta$ -amiloide) forman las placas de amiloide encontradas en los enfermos de EAF. Se han encontrado numerosas mutaciones en este gen implicadas en la EAF y amiloidosis cerebroarterial (angiopatía cerebral amiloide) (APP; OMIM \*104760).

Actualmente se conocen cerca de 30 mutaciones (Bertram *et al.*, 2007; <http://www.alzgene.org/>) que explican aproximadamente el 5% de los casos de EA. Algunos ejemplos:

- "Mutación London ", fue la primera muta-



ción encontrada, y consiste en la sustitución de una valina por una isoleucina en el codón 717 (Goate *et al.*, 1991).

- "*Mutación Swedish*", son mutaciones en los codones 670 y 671. Fueron descubiertas en dos familias suecas con EAF, y consiste en un doble cambio de pares de bases: lisina y metionina son reemplazados por ácido aspártico y leucina, respectivamente, justo delante del extremo N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide (Mullan *et al.*, 1992).

- "*Mutación Flemish*", situada en el codón 692. Resulta de la sustitución de una alanina por una glicina, da lugar a un fenotipo mixto entre EA y una angiopatía congofílica (Hendriks *et al.*, 1992).

- Mutaciones sin sentido en los codones 716, 715, 714, 694, 693 y 665 (ver revisión Rocchi *et al.*, 2003).

Todas estas mutaciones están implicadas en el procesamiento del APP, ya que muchas están cerca de los lugares de corte de las secretasas (*vid.* § 1.1.5.1.2 y 1.1.5.1.3).

#### 1.1.4.1.2 Gen de la Presenilina 1 (PS1) y de la Presenilina 2 (PS2)

Los genes que codifican para PS1 y PS2 se encuentran localizados en el cromosoma 14 (14q24.3) y en el cromosoma 1 (1q31-q42), respectivamente. Mutaciones en estos genes incrementan la producción de la forma más larga del péptido  $\beta$ -amiloide (mayor componente de las placas seniles). Las presenilinas están encargadas de regular el procesamiento del APP a través de su interacción con las  $\gamma$ -secretasas, enzimas que cortan al APP. A su vez, las presenilinas están implicadas en la segmentación de los receptores Notch que actúan directamente en la regulación de la actividad de las  $\gamma$ -secretasas o actuando ellas mismas como enzimas proteolíticas, y en la estabilización de la

$\beta$ -catenina y la homeostasis del calcio intracelular (PSEN1; OMIM \*104311. PSEN2; OMIM \*600759).

Las mutaciones en estos dos genes (PS1 y PS2) engloban aproximadamente el 95% de los casos de EAF (Hoenicka, 2006). Las mutaciones en PS1 ocurren con frecuencia en residuos altamente conservados que afectan a los dominios transmembrana, así como en las regiones de la proteína que conectan dichos dominios. Sin embargo, también se han encontrado mutaciones que producen cambios en el resto de la estructura de la proteína (actualmente se conocen más de 160 mutaciones; Bertram *et al.*, 2007; <http://www.alzgene.org/>). Las mutaciones en PS1 son responsables del 70% de los casos de EAF, y son también por regla general las más agresivas en cuanto a un inicio muy precoz de los síntomas y a una evolución rápida de la enfermedad (Cruts y Van Broeckhoven, 1998).

El gen PS2 fue aislado mediante técnicas de ligamiento genético en familias con EAF y también aprovechando la circunstancia de la disponibilidad de las bases de datos de genes que permitieron mostrar la homología de PS2 con el gen PS1 (Rogaev *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995). La mayoría de las mutaciones para PS2 se producen en los dominios transmembrana altamente conservados (actualmente se conocen más de 10 mutaciones; Bertram *et al.*, 2007; <http://www.alzgene.org/>).

Las presenilinas presentan una elevada similitud entre ellas, llegando a presentar una homología del 90% en sus dominios transmembrana. Si bien, no se conoce con exactitud su función, lo que sí es cada vez más evidente es que están íntimamente unidas al complejo  $\gamma$ -secretasa y por lo tanto al procesamiento de la proteína APP. Además, se ha demostrado que algunas mutaciones

de PS1 causan un incremento en la producción del péptido  $\beta$ -amiloide debido al aumento de la actividad de la  $\gamma$ -secretasa. Aún se desconoce cómo las disfunciones de estos procesos pueden contribuir a la expresión de la EA en los portadores de mutaciones de PS1 (Hoenicka, 2006).

#### **1.1.4.2 Genes implicados en el Alzheimer esporádico**

Los genes implicados en la EAF han sido descubiertos con relativa facilidad debido a que siguen una herencia mendeliana, y las técnicas de genética molecular, a través de la clonación posicional, han podido detectar el *locus* implicado en la gran mayoría de los casos. Pero la realidad es que la gran mayoría de los casos de EA son de tipo esporádico y los genes implicados siguen una herencia no mendeliana de carácter complejo, por lo que su identificación es difícil. En la EAE, los factores genéticos no son los causantes, sino que condicionan una mayor susceptibilidad a sufrir la enfermedad. Es decir, los factores genéticos de predisposición no tienen la fuerza necesaria para la expresión de la enfermedad, pero sí producen un incremento del riesgo a los individuos portadores cuando se compara con la población no portadora. Por lo tanto, ni los factores genéticos ni los ambientales actuando por separado pueden causar la EA de tipo esporádico, ambos son necesarios pero no suficientes para su desarrollo. Actualmente solo se ha identificado un factor de riesgo genético, el gen que codifica para la Apolipoproteína E (ApoE).

##### **1.1.4.2.1 Gen de la Apolipoproteína E**

Representa el único factor de riesgo confirmado tanto para la EA de tipo esporádico, como para la de tipo familiar (Rocchi *et al.*, 2003; Hoenicka, 2006; Mahley *et al.*, 2006).

En las lipoproteínas humanas se conocen

un total de nueve apolipoproteínas principales, una de las cuales es ApoE que se encuentra formando parte de las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), la IDL (lipoproteínas de densidad intermedia) y de la HDL (lipoproteínas de alta densidad).

ApoE está implicada en el metabolismo lipídico, el mantenimiento de las conexiones axodendríticas, la retirada de toxinas y la reparación de tejidos. En el cerebro se sintetizan principalmente en astrocitos y en células de la microglía (Poirier *et al.*, 1994). Existen distintas hipótesis acerca del papel de la ApoE en el desarrollo de la EA: aumentar la producción del péptido  $\beta$ -amiloide (Ye *et al.*, 2005), inducción de la rotura lisosomal y apoptosis (Ji *et al.*, 2006; Mahley, 2006) e implicación en diversos procesos de neurotoxicidad, translocación al citosol, unión a la mitocondria y efectos en la fosforilación de tau (Ji *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Reynolds y Rintoul, 2004; Harris *et al.*, 2003). En 1993, Stritmatter y su grupo observaron una mayor incidencia (30-50%) del alelo  $\epsilon 4$  en pacientes con EA cuando se les comparaban con individuos sanos de la misma edad (10-15%) (Stritmatter *et al.*, 1993).

##### **1.1.4.2.2 Genes que incrementan la susceptibilidad de padecer Alzheimer esporádico**

El gran avance en técnicas de biología y genética molecular ha permitido la identificación de numerosos genes involucrados en la aparición de EA (alrededor de 100 genes) (Bertram *et al.*, 2007; <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/default.asp>). Sin embargo, no se ha demostrado la implicación directa de ninguno de estos genes excepto en el caso de la

ApoE (Hoenicka, 2006). Algunos ejemplos son: gen del receptor de las VLDL, gen de la  $\alpha$ -1 antitripsina, gen de butirilcolinesterasa K, gen de ubiquitina, gen de la proteína  $\tau$ , genes mitocondriales (citocromo -oxidasas I y II) y genes de las interleucinas 1A y 1B.

#### 1.1.4.3 Factores de riesgo no genéticos

Se está estudiando la implicación de los factores ambientales y la posible interacción genes/ambiente subyacentes al proceso neurodegenerativo. A parte del envejecimiento, el factor de riesgo más importante es tener un familiar de primer grado afectado de EA.

##### 1.1.4.3.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción de la genética del individuo y su medio ambiente. Podría también definirse como todas las modificaciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a pérdidas funcionales y a la muerte. Es difícil determinar el momento en el que se inicia, puesto que el envejecimiento no es un fenómeno genéticamente programado. Sin embargo, a partir de los setenta años, aparece un incremento notable en la probabilidad de desarrollar desórdenes neurodegenerativos.

Las células del sistema nervioso se ven afectadas como consecuencia del proceso normal de envejecimiento, apareciendo un incremento en el estrés oxidativo, iónico y metabólico, dando lugar a una acumulación en el daño proteico del ADN (Mattson y Magnus, 2006).

Las alteraciones asociadas al envejecimiento en un cerebro senil son numerosas,

pero no tan acusadas como en las enfermedades neurodegenerativas. Anatómicamente, existe un descenso del peso y del volumen cerebral, un ensanchamiento ventricular y un estrechamiento de las circunvoluciones cerebrales.

Las alteraciones son similares a las que se pueden observar en la EA, apareciendo placas seniles y ovillos neurofibrilares distribuidas aleatoriamente en el hipocampo y corteza cerebral de la mayoría de las personas normales "seniles", afectando, en mayor o menor grado, a todas las áreas sensoriales, motoras y de asociación, distinguiéndose de la EA en que no produce desórdenes neurodegenerativos tan pronunciados como en la EA. De hecho, la EA ha sido definida como "un envejecimiento acelerado" del organismo, inducido por un conjunto de factores genéticos, moleculares y ambientales.

##### 1.1.4.3.2 Estrés oxidativo

Existen numerosos estudios que sugieren la implicación del estrés oxidativo como uno de los principales mecanismos patogénicos relacionados con la EA (Maccioni *et al.*, 2001; Mattson, 2004). El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del organismo para eliminar su exceso, dando lugar a daños oxidativos moleculares a nivel tisular, incluyendo el tejido cerebral.

##### 1.1.4.3.3 Otros factores

Existen diversos factores ambientales involucrados en la aparición y grado de la EA: **Género:** aunque la severidad de esta demencia es similar en ambos sexos, estudios epidemiológicos sugieren que el declive en los niveles de estrógeno seguido de la menopausia podría incrementar el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas en mujeres (Maccioni *et al.*, 2001).

**Daños vasculares:** como la hipertensión arterial, diabetes mellitus, fibrilación atrial, aterosclerosis vascular generalizada e isquemia cerebral (Schmidt *et al.*, 2000). Se ha demostrado que individuos que han sufrido infartos cerebrales y aterosclerosis, poseen una mayor pérdida cognitiva, un mayor grado de demencia y una mayor frecuencia de placas neuríticas en comparación con individuos sanos (Snowdon *et al.*, 1997, Honig *et al.*, 2005). Otros estudios ponen de manifiesto que la asociación entre aterosclerosis y demencia es particularmente intensa en individuos que poseen el alelo  $\epsilon 4$  de la ApoE (Hofman *et al.*, 1997; Yip *et al.*, 2005).

**Bajo nivel educacional:** las personas con menor nivel educacional tienen menor capacidad de compensar los daños cognitivos que se dan en los primeros estadios de la EA (Reiman y Caselli, 1999).

**Traumas cerebrales:** relacionado con repeticiones de daños cerebrales como es común que sufran los boxeadores (Katzman y Kawas, 1994).

**Dieta:** estudios en roedores, monos y humanos indican que cuando son sometidos a restricciones dietéticas (disminución de la cantidad de ingesta de alimentos o frecuencia), se aprecia un retraso en los efectos del envejecimiento. En concreto, se ha observado un menor déficit cognitivo y de funciones motoras, daño en el ADN y estrés oxidativo. En estos modelos con restricciones dietéticas se ha observado que se potencia la producción de factores neurotróficos como "BDNF" y la neurogénesis (ver revisión Mattson y Magnus, 2006).

**Metales:** la ingesta de metales presentes en la bebida o en los alimentos, o bien exposiciones en el ambiente puede dar lugar a su acumulación en el cerebro. Estos metales pueden producir un incremento de estrés oxidativo.

Se ha observado que la homeostasis del cobre, hierro y zinc se encuentra alterada en cerebros de individuos con Alzheimer. En concreto se ha observado que bajo condiciones ácidas suaves, tales como las que se piensa que ocurren en el Alzheimer, el hierro y el zinc inducen la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide. Parece ser que el papel del cobre es controvertido: por una parte el APP posee sitios de unión al cobre, por lo que hay evidencias que el cobre participa en la agregación del  $A\beta$ , sin embargo se piensa que el APP regula la concentración de cobre celular (Coppede *et al.*, 2006).

**Síndrome de Down:** individuos adultos con el síndrome de Down desarrollan las marcas histopatológicas de la EA a edades tempranas, concretamente a partir de 40 años de edad, aunque no todos los individuos desarrollan demencia. El riesgo de padecer la EA se incrementa el doble o el triple en una familia con un historial de síndrome de Down (Mayeux, 2003).

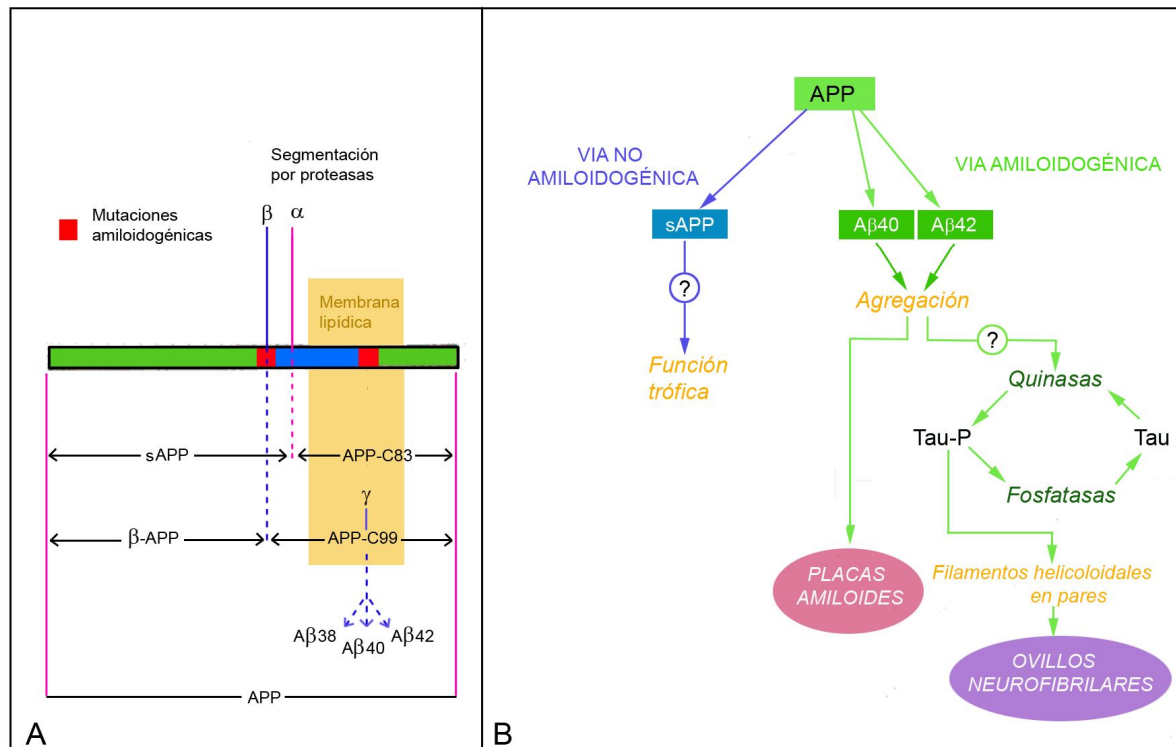
### 1.1.5 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.1.1, a nivel microscópico, las lesiones características en la EA son la aparición de placas seniles (agregados del péptido  $\beta$ -amiloide y de prolongaciones dendríticas y axónicas degeneradas o en fase de degeneración y prolongaciones gliales alteradas) y ovillos neurofibrilares (formados por la proteína tau hiperfosforilada) en las estructuras del lóbulo temporal medial y áreas corticales del cerebro, junto con una degeneración neuronal y una disfunción sináptica.

#### 1.1.5.1 Péptido amiloide

##### 1.1.5.1.1 Proteína precursora del péptido amiloide (APP)

APP pertenece al grupo heterogéneo de



**Figura 4. Esquema representativo del procesamiento del APP.** (A) Proteína precursora del amiloide transmembrana, indicando los distintos sitios de corte por las secretasas. (B) Cascada de procesamiento del APP.

glucoproteínas transmembrana del tipo I. Aparecen de forma ubicua en varios tipos celulares y se caracterizan por la presencia de una señal terminal peptídica, un gran ectodominio para N-glucosilaciones, una región transmembrana en forma de hélice y un pequeño dominio citoplasmático (Kang *et al.*, 1989).

Debido a un *splicing* alternativo, existen tres isoformas de APP en mamíferos de 695 (695APP), 751 (751APP) y 770 (770APP) aminoácidos, respectivamente. Las formas 751APP y 770APP se expresan principalmente en células no neuronales, mientras que los mayores niveles de APP neuronales corresponden a la isoforma 695APP (Haass *et al.*, 1992).

Tras su síntesis en el retículo endoplasmático, APP sufre grandes modificaciones post-transcripcionales como son: glucosilaciones complejas en el mismo retículo endoplasmático, fosforilaciones y sulfata-

ciones durante el tránsito hacia la membrana plasmática y escisiones proteolíticas por proteasas llamadas α-, β- y γ-secretasa, durante su secreción e internalización de la vía secretora. Estas escisiones se agrupan en dos vías: vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica (Figura 4).

#### 1.1.5.1.2 Vía no amiloidogénica

La primera actividad proteolítica descrita, fue la denominada α-secretasa, la cual realiza una escisión en el APP695 dentro del dominio constituido entre los residuos Lys687 y Leu688 (residuos aminoácidos 16 y 17). Como consecuencia de este procesamiento proteolítico se libera el ectodominio amino-terminal del APP (sAPP) al lumen extracelular o al lumen vesicular, mientras que una secuencia de 83 residuos aminoácidos junto con el extremo carboxi-terminal (APP-C83) queda anclada a la membrana. La producción de sAPP se incrementa como respuesta a la actividad eléctrica y a la acti-

vación de los receptores muscarínicos, lo que sugiere que la actividad neuronal incrementa el procesamiento proteolítico del APP por la  $\alpha$ -secretasa.

Posteriormente, el fragmento carboxi-terminal anclado a la membrana puede sufrir una escisión por la  $\gamma$ -secretasa entre los residuos aminoácidos 711 y 713, liberando por una parte, un péptido llamado p3 ( $A\beta$ 17-40 y  $A\beta$  17-42) al lumen extracelular o vesicular y por otra el dominio intracelular del APP (AICD) al citosol celular.

Las proteínas con actividad  $\alpha$ -secretasa más implicadas en el procesamiento del APP son miembros de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM).

#### **1.1.5.1.3 Vía amiloidogénica: síntesis del péptido $\beta$ -amiloide:**

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) deriva del APP por la acción de dos aspartil proteasas referidas como  $\gamma$ - y  $\beta$ -secretasa (Haass *et al.*, 1992). APP sufre una escisión por la  $\beta$ -secretasa entre los residuos aminoácidos Met671 y Asp672, originándose un ectodominio amino-terminal soluble ligeramente más pequeño ( $\beta$ -APP), mientras que la secuencia anclada en la membrana contiene 99 residuos aminoácidos (APP-C99). El fragmento APP-C99 puede sufrir un corte proteolítico por caspasas produciendo un fragmento neurotóxico C-31. La actividad  $\beta$ -secretasa es realizada por la proteína conocida como BACE 1 (enzima que corta el APP en el sitio  $\beta$ ). BACE es una aspartil proteasa transmembrana de tipo 1, que se localiza principalmente en la cara *Trans* Golgi y en compartimentos endosomales, en relación con datos previos donde se demuestra que la actividad  $\beta$ -secretasa ocurre en estos compartimentos (Selkoe, 1998). Posteriormente a la actividad  $\beta$ -secretasa, el fragmento APP-C99 es sustrato para la  $\gamma$ -secretasa, que reali-

za una escisión proteolítica a nivel de los residuos aminoácidos 711-713. Dependiendo del punto exacto de corte, produce las tres formas principales de  $A\beta$ :  $A\beta$ 38,  $A\beta$ 40 y  $A\beta$ 42 residuos respectivamente. Estos péptidos son liberados al lumen extracelular o vesicular y el dominio intracelular del APP al citosol celular (AICD).

La actividad  $\gamma$ -secretasa es llevada a cabo por un complejo proteico formado por cuatro proteínas diferentes: Presenilinas 1 o 2 (PS1 o PS2), Nicastrina, Aph-1 y Pen-2. El sitio activo de la  $\gamma$ -secretasa requiere actividad aspartil proteasa que se encuentra en la presenilina, mientras que Nicastrina, Pen-2 y Aph1 participan en la modulación de la actividad de la  $\gamma$ -secretasa, dependiendo en la vía proteolítica donde actúe o en respuesta a estímulos fisiológicos (Maccioni *et al.*, 2001; Selkoe, 2001; Morishima-Kawashima y Ihara, 2002; Sisodia y George-Hyslop, 2002; Van Gassen y Annaert, 2003; Mattson *et al.*, 2004; Blennow *et al.*, 2006, Walsh y Selkoe, 2007).

#### **1.1.5.1.4 Formas del péptido $A\beta$ y su implicación en la enfermedad de Alzheimer**

El péptido  $A\beta$  se sintetiza en forma de monómeros solubles que se agregan para formar complejos multiméricos solubles (dímeros y trímeros de bajo peso molecular) e insolubles (fibrillas y protofibrillas de elevado peso molecular). Las agrupaciones de fibrillas y otras especies intermedias, son las que forman parte de las **placas seniles o placas de  $A\beta$** , características de la EA. Al comienzo del estudio de esta enfermedad, se pensaba que eran estas placas las que producían las alteraciones cognitivas características de esta enfermedad, pero estudios posteriores indicaron que no existe correlación entre el número de placas presentes en un enfermo de Alzheimer con el daño cog-

nitivo que este presenta (Katzman, 1986, Terry *et al.*, 1991, Dickson, 1995).

Estudios recientes (García-Marin *et al.*, 2010) indican que una de las principales alteraciones que inducen las placas consiste en una disminución notable en la inervación perisomática de las células piramidales que se encuentran en contacto con las placas. Actualmente existen numerosos estudios que apuntan a que son los oligómeros de A $\beta$ , los que mayor implicación tienen en el declive cognitivo característico de esta enfermedad.

#### 1.1.5.1.4.1 Oligómeros

Los oligómeros se pueden encontrar intracelular o extracelularmente. Estudios en modelos murinos para la EA, indican que los oligómeros solubles de A $\beta$  intracelulares, principalmente el A $\beta$ 42, sintetizados en fases iniciales de la enfermedad previa a la formación de placas, están implicados en disfunción sináptica, alteraciones fisiológicas y neuríticas (Chapman *et al.*, 1999; Holcomb *et al.*, 1998; Hsia *et al.*, 1999; Moechars *et al.*, 1999; Oddo *et al.*, 2003b; Billings *et al.*, 2005; Capetillo-Zarate *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2006), y alteraciones de aprendizaje, memoria y potenciación a largo plazo (Walsh *et al.*, 2002; Cleary *et al.*, 2005). Además, se ha observado que especies oligoméricas de A $\beta$  extracelular están implicadas en procesos de reducción de la plasticidad sináptica y alteración sináptica (Selkoe, 2002; Walsh *et al.*, 2002; Trinchese *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2008; Deshpande *et al.*, 2009).

Por otra parte, estudios bioquímicos indicaron que la magnitud del reservorio soluble de A $\beta$ 42 presenta el mayor correlato de grado y deterioro cognitivo en pacientes con EA (Naslund *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 1996; McLean *et al.*, 1999).

#### 1.1.5.1.4.2 Placas seniles

Actualmente existe controversia con respecto a la clasificación de las placas atendiendo a su morfología. Una de las más seguidas es la propuesta por Wisniewski y Terry (Wisniewski y Terry, 1973) que clasificaron las placas de A $\beta$  en:

**Placas primitivas**, formadas por neuritas degeneradas con algún depósito visible de amiloide a nivel ultraestructural.

**Placas clásicas o típicas**, placas primitivas en las que el proceso de degeneración continúa y forma un núcleo central de amiloide.

**Placas compactas o quemadas**, las neuritas están completamente degeneradas dejando solo el depósito de amiloide.

**Placas difusas**, fibras diseminadas de amiloide sin componentes neuríticos (Yamaguchi *et al.*, 1989).

Las placas de A $\beta$  no solo están compuestas por neuritas distróficas y A $\beta$ . Debido a que la formación de la placa desencadena una respuesta inflamatoria existe un halo de microglía activada rodeando la placa y hay astrocitos en la zona más periférica. Mediante técnicas de microscopía electrónica se ha observado que las neuritas distróficas contienen principalmente lipofucsina, mitocondrias en degeneración y tau hiperfosforilada, y que por sus características morfológicas la mayoría de las neuritas distróficas parecen ser axones. Tanto las placas de A $\beta$  como las neuritas distróficas se pueden marcar utilizando tinciones de plata (Campbell-Switzer, Bielschowsky y Bodian), técnicas histoquímicas (rojo congo y tioflavina s-t) (Figura 5) o técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos que reconocen de forma selectiva A $\beta$  y tau hiperfosforilada.

Actualmente, se piensa que las placas de A $\beta$  producen un microambiente tóxico para las dendritas y que contribuyen a una disfunción sináptica en los circuitos neuronales

en la EA (Tsai *et al.*, 2004; Spires *et al.*, 2005; Knafo *et al.*, 2008; Knafo *et al.*, 2009; Merino-Serrais *et al.*, 2010).

### 1.1.5.2 Proteína Tau

Tau es una proteína de 55kDa de peso que se expresa de forma muy abundante en el cerebro. En el cerebro humano existen seis isoformas distintas, sintetizadas a partir de un solo gen localizado en el cromosoma 17q mediante *splicing* alternativo. Estas isoformas se diferencian entre ellas por la presencia de 3-4 repeticiones de unión a microtúbulos de 31-32 aminoácidos localizadas en tándem en su porción C-terminal: tres (3R taus) o cuatro repeticiones (4R taus). Las isoformas de tau 3R y 4R se encuentran en igual proporción en el cerebro adulto. Alteraciones en esta proporción han sido relacionadas con la taupatía neurodegenerativa de demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17; Blennow *et al.*, 2006; Ballatore *et al.*, 2007; Iqbal *et al.*, 2009). Hoy en día no existe ninguna mutación del gen tau asociada a la EA.

Tau es una proteína multifuncional asociada a los microtúbulos. Se encuentra en el citosol, principalmente en los axones de las células nerviosas, aunque también puede encontrarse asociada a la membrana celular. Su función principal es el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, por lo que contribuye de forma directa al mantenimiento de la morfología neuronal, transporte axónico, neurogénesis y transporte entre el interior y el exterior de la neurona.

La proteína tau es una fosfoproteína, cuya afinidad para unirse a microtúbulos viene determinada por la fosforilación mediante quinasas y fosfatasas de sus residuos serina/treonina (Ser202, Thr205, Ser396, Ser404).

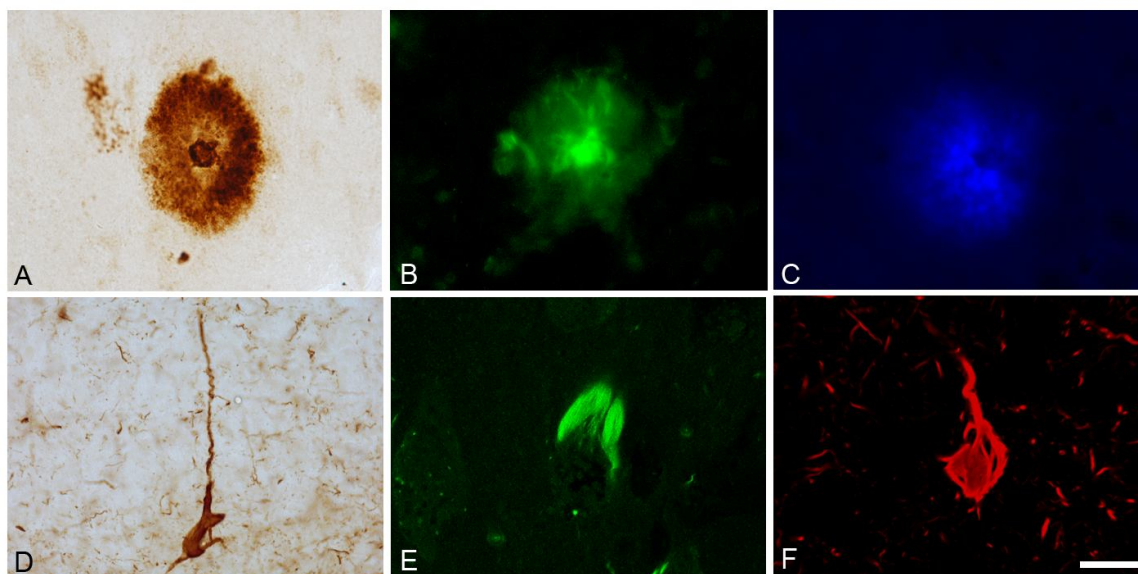
En situaciones fisiológicas normales, tau

se encuentra en constante equilibrio dinámico, ensamblando y desensamblando microtúbulos. Sin embargo, en cerebros que presentan la EA, tau se encuentra hiperfosforilada o fosforilada en sitios que no se encuentran habitualmente fosforilados en cerebros adultos (Matsuo *et al.*, 1994), presentando modificaciones estructurales y conformacionales que afectan a su unión a tubulina y confiriéndole más resistencia a la proteólisis. Se ha visto que la proteína tau hiperfosforilada se encuentra también en compartimentos somato-dendríticos, donde se asocia con el retículo endoplasmático rugoso y con el aparato de Golgi (Iqbal *et al.*, 2009). Los mecanismos que producen la hiperfosforilación de tau, se desconocen. Pero todos ellos producen una desregulación en el balance fosforilación/desfosforilación de tau.

#### 1.1.5.2.1 Formas de la proteína tau hiperfosforilada y su implicación en la enfermedad de Alzheimer

Una vez que tau se encuentra hiperfosforilada, adquiere resistencia a la proteólisis y aumenta la concentración de **tau hiperfosforilada citosólica libre**. Se considera la especie más tóxica, debido a que pierde su afinidad por los microtúbulos y se separa de ellos provocando la formación de **ovillos neurofibrilares (NF)**. También produce un efecto tóxico uniéndose a proteínas tau normales y otras proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Se ha propuesto que la presencia de tau hiperfosforilada soluble correlaciona con el daño cognitivo característico de la EA (Santacruz *et al.*, 2005). Esta tau hiperfosforilada citosólica libre se acumula en pequeños depósitos que sufren una reorganización estructural formando las láminas- $\beta$  que constituyen los filamentos pareados helicoidales (PHF-tau) y los





**Figura 5. Imágenes tomadas en la formación del hipocampo de un paciente de Alzheimer.** (A,-C), placas  $\beta$ -amiloide marcadas selectivamente con: (A)  $\beta$ -amiloide, (B) tioflavina-s y (C) tioflavina-t. (D-F), ovillos neurofibrilares marcados selectivamente con: (D) PHF<sub>AT8</sub>-tau, (E) tioflavina-s y (F) PHF-tau. Barra de escala, (A-C) 25 $\mu$ m; (D) 20  $\mu$ m; (E-F) 10 $\mu$ m.

filamentos rectos que posteriormente se ensamblarán dando lugar a los NF. Existen distintas técnicas que se utilizan para marcar los NF: métodos inmunocitoquímicos para la proteína tau o tinciones histoquímicas como tioflavina-s y tioflavina-t (Figura 5).

Actualmente existe una gran controversia acerca de la función de los NF. Por un lado se piensa que pueden presentar un papel neuroprotector frente al desensamblaje de los microtúbulos secuestrando a la proteína tau hiperfosforilada (Andorfer *et al.*, 2003; Santacruz *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Spires-Jones *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2009). Por otro, se piensa que tienen un efecto tóxico debido a que están asociados a alteraciones del transporte axónico que culminan en muerte celular (Stamer *et al.*, 2002; Terwel *et al.*, 2002; Cente *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007) y a la elevada correlación entre pérdida de marcadores sinápticos y presencia de NF (Honer *et al.*, 1992; Masliah *et al.*, 1992; Wakabayashi *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 1996; Samuel *et al.*, 1997; Heffernan *et al.*,

1998). No obstante, no existe correlación entre la presencia de NF y el deterioro cognitivo característico de la EA o muerte celular (Andorfer *et al.*, 2003; Santacruz *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios recientes en la formación del hipocampo de pacientes con EA muestran que las neuronas piramidales que presentan NF aparentemente mantienen intacta su inervación perisomática (Blazquez-Llorca *et al.*, 2010). Por último, a parte de los NF en el soma neuronal, podemos encontrar en el neuropilo **neuritis distróficas** asociadas a las placas seniles y los **hilos del neuropilo** (acumulaciones de PHF-tau en forma de hilos) que se dan en ciertas prolongaciones neuronales.

### 1.1.5.3 Progresión de la Enfermedad de Alzheimer

En 1991 Braak y Braak (Braak y Braak, 1991) establecieron seis estadios para definir el avance de la EA, basados en la presencia de NF, cuya distribución espacio-temporal sigue un patrón estereotipado. Estos estadios no se correlacionan con la progresión de la demencia característica de la EA, apa-

reciendo ésta en los últimos estadios de la clasificación de Braak y Braak. Es decir, los primeros estadios cursan de forma asintomática, pudiendo tener la enfermedad pero no la demencia, pasando prácticamente inadvertida hasta los últimos estadios en los que la progresión de la patología neurofibrilar está muy avanzada.

En el desarrollo de la EA, se observan los primeros NF en la corteza entorrinal y transentorrinal, conformando los estadios I y II (**estadios transentorrinales**). Posteriormente se produce una mayor afectación de la corteza entorrinal y comienzan a aparecer en el subículo y en la región CA1 de la formación del hipocampo: estadios III y IV (**estadios límbicos**). La progresión continúa hasta afectar a las áreas de asociación neocorticales, apareciendo numerosos NF: estadios V y VI (**estadios isocorticales**).

Con respecto a la patología amiloide, Braak y Braak (1991) también establecieron un patrón de progresión espacio-temporal basado en la acumulación de los depósitos de  $\beta$ -amiloide. En el **estadio A**, estos depósitos se acumulan en las regiones basales-mediales de la neocorteza y formación del hipocampo. Posteriormente, en el **estadio B** avanzan hasta situarse en todas las áreas de asociación y aumentan en las regiones basales-mediales de la neocorteza. La progresión de los depósitos de  $\beta$ -amiloide continúa hasta distribuirse en todas las áreas de la corteza cerebral, lo que se conoce como **estadio C**. La presencia de placas no presenta correlación con la demencia tipo Alzheimer (Terry *et al.* 1991) y sucede lo mismo que con la patología neurofibrilar, la enfermedad es asintomática hasta que la acumulación de depósitos de  $\beta$ -amiloide es elevada (Figura 6).

#### 1.1.5.4 Hipótesis de la cascada de amiloide

En 1992, John A. Hardy y Gerald A. Hig-

gins (Hardy y Higgins, 1992) propusieron la hipótesis de la cascada de amiloide, según la cual, la deposición de la proteína  $\beta$ -amiloide (principal componente de las placas de  $\beta$ -amiloide) es la causa inicial de la aparición de la patología de la EA, aparición de NF, muerte celular, daño vascular y demencia.

Se basaron principalmente en la presencia de la patología amiloide en la enfermedad de síndrome de Down. Este síndrome es causado por una trisomía en la región del cromosoma 21 que contiene el gen APP. El síndrome de Down cursa sin patología neurofibrilar por lo que concluyeron que no es necesaria la presencia de la proteína tau hiperfosforilada para desencadenar la enfermedad. Por otro lado, la presencia de patología neurofibrilar en la DFTT-17 sin existencia de la patología amiloide demuestra la gran importancia que posee la patología neurofibrilar por sí sola, sin la presencia de  $\beta$ -amiloide. Esta teoría sugiere que la patología neurofibrilar es la que iniciaría la EA.

Actualmente sigue siendo un tema controvertido y hay evidencias en los dos sentidos (Prince y Morris, 2004).

#### 1.1.5.5 Pérdida sináptica y neuronal

En fases iniciales de la EA se produce una alteración sináptica en el hipocampo y neocorteza que es atribuida a la presencia de oligómeros y que es el principal correlato estructural de disfunción cognitiva en la EA (*vid.* § 1.1.5.1.4.1).

Además de la pérdida sináptica, la EA se caracteriza por una pérdida neuronal en las regiones corticales implicadas en la memoria y el aprendizaje. Así, se ha descrito una pérdida neuronal significativa en pacientes con EA en la región CA1 (West *et al.*, 1994), subículo, en la capa II de la corteza entorrinal y en las capas III y V en áreas de asocia-

ción (Gomez-Isla *et al.*, 1996).

### 1.1.6 Modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer

El uso de modelos transgénicos para el estudio de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas está muy extendido. Su éxito se debe a la reproducción relativamente fácil de las colonias de estos animales de experimentación que permite estudiar diversos aspectos de la enfermedad a lo largo de su curso temporal. Aunque un modelo transgénico sea una buena alternativa para el estudio de una enfermedad, no hay que olvidar que solo se trata de una simplificación de la patología que además no se da de forma natural en dichos animales y que afecta a funciones cognitivas pro-

pias de la especie humana.

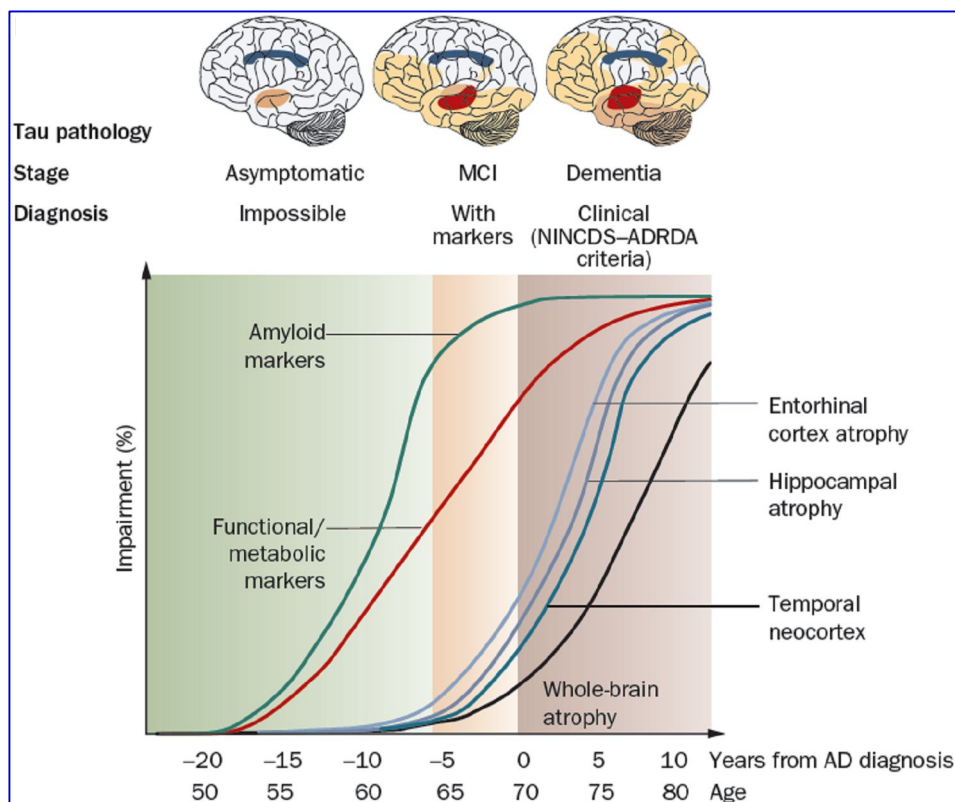
Fue en el año 1995 cuando Games y su grupo (Games *et al.*, 1995) describieron el primer ratón transgénico para APP (PDAPP) que desarrollaba placas  $\beta$ -amiloides a los 6-9 meses de edad.

Hoy en día existen numerosos modelos para la EA, siendo los más extendidos los modelos que expresan la patología amiloide.

En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio del modelo transgénico APP/PS1 que se describe a continuación:

#### 1.1.6.1 Modelo APP/PS1

En el presente estudio hemos empleado como modelo transgénico para la EA, APPswe, PSEN1dE9 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU). Dicho modelo, se



**Figura 6. Modelo teórico de la progresión de marcadores cognitivos en la EA.** Los marcadores amiloides (PET y A $\beta$  42 en fluido cerebroespinal) representan los primeros cambios detectables en el curso de la enfermedad, alcanzando valores muy elevados en la etapa intermedia de la enfermedad. Marcadores funcionales y metabólicos (MRI funcional y PET F-fluorodeoxiglucosa) se encuentran en baja proporción en la etapa intermedia (deterioro cognitivo leve; MCI) y van aumentando conforme avanza la enfermedad. Los cambios estructurales aparecen más tarde, tras la aparición de la patología de tau. Abreviaciones: AD, enfermedad de Alzheimer; MCI, Deterioro cognitivo leve; NINCDS-ADRDA, Instituto Nacional de apoplejías y desórdenes comunicativos y neurológicos- Enfermedad de Alzheimer y desórdenes relacionados. Tomado de Frisoni *et al.*, 2010.

obtuvo tras la conjunción de la mutación en el gen de la proteína precursora de amiloide humana, Mo/Hu APP695-swe (conocida como mutación *swedish*) (Hsiao *et al.*, 1996) con una mutación del gen de la presenilina 1 humana, PS1-dE9 (delección en el exón 9) (Scheuner *et al.*, 1996). Este modelo se caracteriza por presentar placas  $\beta$ -amiloide a partir de los seis meses de edad en la corteza cerebral (incluyendo el cuerpo calloso y la formación del hipocampo), gliosis, neuritis distróficas, y pérdida de memoria espacial entre los 6 y 15 meses de edad (Minkeviciene *et al.*, 2008; Figura 7). Sin embargo no presentan pérdida neuronal (Irizarry *et al.*, 1997).

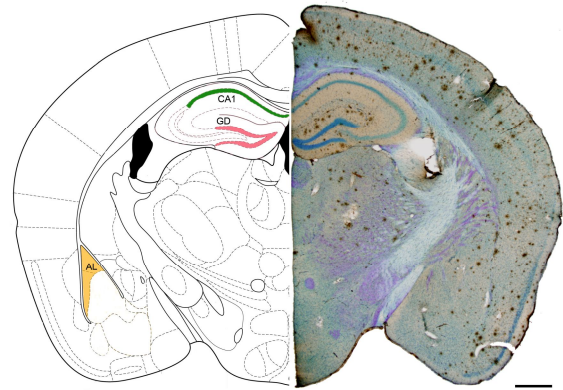
## 1.2 Corteza cerebral

En el presente trabajo nos centraremos en el estudio microanatómico de distintas partes de la corteza cerebral que incluyen la formación del hipocampo y la corteza parahipocampal, y de la amígdala lateral.

### 1.2.1 Formación del hipocampo

#### 1.2.1.1 Definición

La formación del hipocampo (Figura 8) se sitúa en la cara medial del lóbulo temporal, adyacente al asta ventral del ventrículo lateral. Junto con el área perirrinal y parahipocampo posterior constituye el sistema mesial de memoria, el cual tiene un papel crucial en el procesamiento y consolidación de la memoria, constituyendo una estructura de flujo de información bidireccional de todas las regiones asociativas corticales del sistema nervioso central (Squire y Zola-Morgan, 1991; Alvarez *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la formación del hipocampo interviene en la consolidación de la memoria declarativa, tanto de tipo semántico (recuerdo de hechos y conceptos), como de tipo episódico (recuerdo de eventos biográficos significativos para el indivi-



**Figura 7. Sección transversal del cerebro de un ratón APP/PS1.** A la izquierda, mapa citoarquitectónico basado en el atlas de Paxinos y Franklin 2001, mostrando la amígdala lateral (AL; amarillo), el giro dentado (GD; rojo) y CA1 (verde). A la derecha, sección teñida inmunocitoquímicamente y con anti-A $\beta$  y contrateñida con Nissl. Barra de escala, 800 $\mu$ m.

duo). A su vez, participa en la elaboración de la memoria visuoespacial, que implica el recuerdo de configuraciones espaciales (Squire y Zola-Morgan, 1991; Maguire *et al.*, 2000).

#### 1.2.1.2 Estructura

Se denomina formación del hipocampo al conjunto formado por el giro dentado, hipocampo propio, complejo subicular (presubiculo, parasubiculo y subículo) y corteza entorrinal (Insausti y Amaral, 2004). Con respecto a su citoarquitectura, el giro dentado, el hipocampo propio y el complejo subicular corresponden al tipo de corteza **alocorteza** (típica de paleocorteza y arquicorteza), que se caracteriza por estar compuesta por tres láminas (Figura 9A):

- Capa celular: formada por neuronas granulares del giro dentado y células piramidales en el hipocampo propio y subículo. Las neuronas de esta capa se denominan *neuronas principales*.
- Capa molecular: formada por las dendritas de las células principales, axones aferentes procedentes de otras regiones y algunas neuronas polimórficas.
- Capa polimórfica: formada por dendritas

basales y axones de las células principales, células polimórficas y axones aferentes.

La corteza entorrinal corresponde al tipo de corteza **mesocorteza** (perialocorteza), la cual engloba, junto con la corteza entorrinal, a la corteza parahipocampal posterior y a la corteza cingular (circunvolución cingular o del cuerpo calloso). La mesocorteza se caracteriza por ser una corteza de transición entre la allocorteza y la isocorteza (formada por seis capas y característica de la neocorteza). Presenta una laminación en seis capas más o menos diferenciadas (Figura 9A,7-8):

- Capa I o molecular: poca densidad neuronal. Similar a la capa I isocortical.
- Capa II y capa III: forman la lámina superficial.
- Capa V y capa VI: forman la lámina profunda.

Las láminas superficiales y profundas se encuentran separadas por una zona parvocelular más o menos evidente, la *lamina disicans* (Rose *et al.*, 1927).

Algunos autores consideran la *lamina disicans* como la capa IV debido a su homología con la capa IV de la isocorteza (Insausti *et al.*, 1995) y otros subdividen la lámina profunda en capa V y VI (Lorente de Nó, 1933; Van Hoesen, 1995).

A continuación se hará una breve introducción a las estructuras de la formación del hipocampo estudiadas en este trabajo:

### 1.2.1.3 Giro dentado

El Giro dentado (GD) corresponde al tipo de corteza allocorteza y está formada por tres capas: granular, molecular y polimórfica. La **capa granular** es una lámina fina compuesta por numerosas células pequeñas y redondeadas (tipo granular). Son células de proyección y presentan espinas dendríticas. Las células granulares reciben la mayoría de sus aferencias en las dendritas as-

cendentes que se ramifican superficialmente en la **capa molecular**, donde además se encuentran algunas interneuronas dispersas. En el caso del ratón, las células granulares carecen de dendritas basales, por lo que todas sus dendritas se encontrarán en la capa molecular. Los axones de las células granulares forman las fibras musgosas que proyectan hacia CA3. Por debajo de la capa granular se encuentra la **capa polimórfica**, en la cual podemos encontrar células grandes y dispersas de tipo polimórfico. En el caso de primates podemos encontrar dendritas basales de las células granulares (Seress y Mrzljak, 1987).

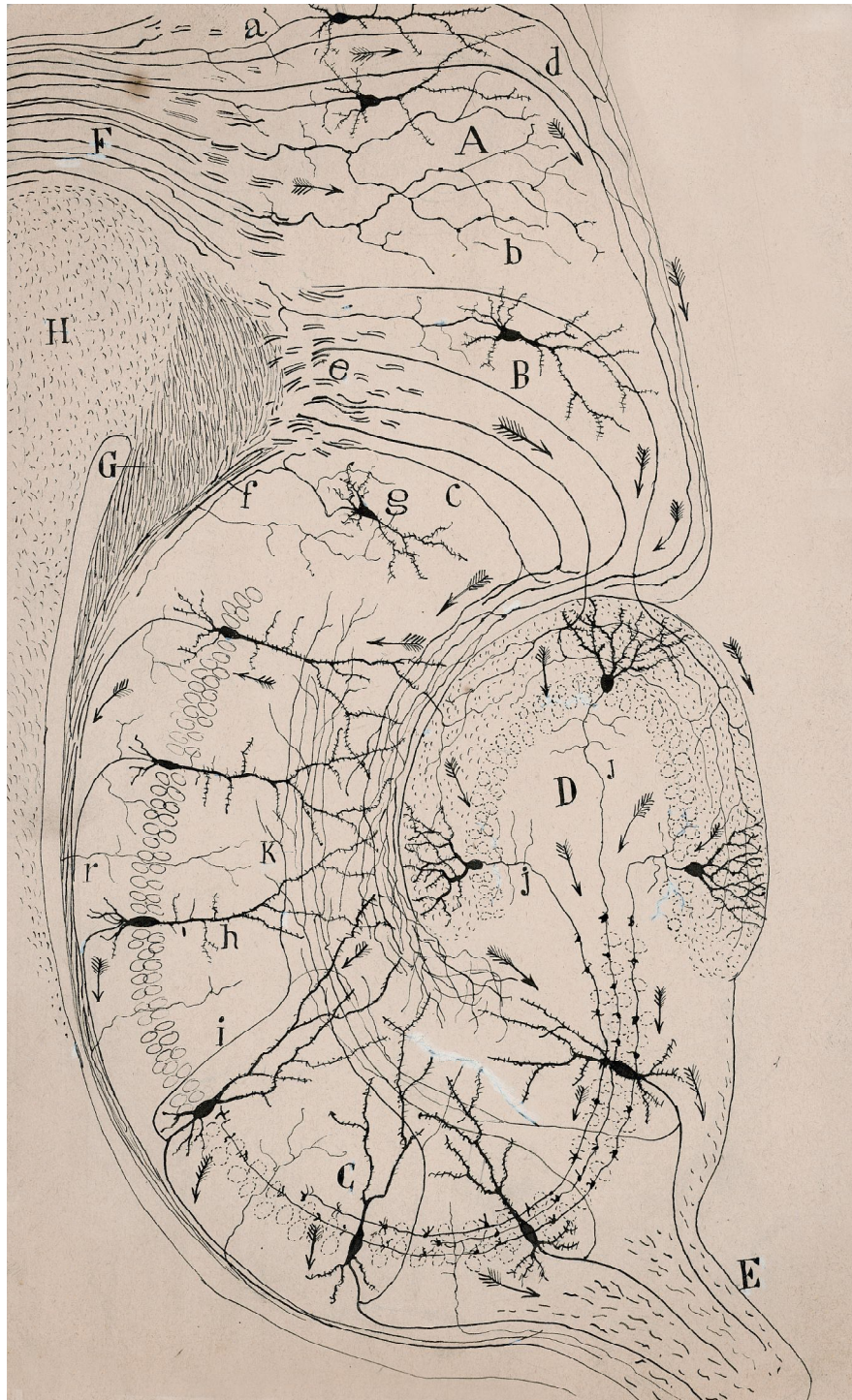
Tanto en ratón como en el hombre, el término *hilus* ha sido empleado para definir la región comprendida por la capa polimórfica (Amaral e Insausti, 1990). Sin embargo, en el caso de los estudios realizados con primates, ciertos autores emplean este término para referirse a la región comprendida por la capa polimórfica y el campo CA4 (Lorente de Nó, 1934). En el presente trabajo seguiremos la nomenclatura empleada por Amaral e Insausti (Amaral e Insausti, 1990).

### 1.2.1.4 Hipocampo propio

Está formado por el asta de Amón o *cornu ammonis* (CA). Fue llamado así por primera vez por Lorente de Nó en el año 1934 que distinguió cuatro regiones amónicas: denominadas CA1-CA4. Sin embargo, debido a que CA4 no tiene características citoarquitectónicas ni patrones de conexiones que le permitan diferenciarse de CA3, Amaral e Insausti propusieron que ambas regiones se denominaran CA3 (Amaral e Insausti, 1990). En el presente trabajo seguiremos la clasificación del hipocampo propio sugerida por Amaral e Insausti.

La citoarquitectura del hipocampo fue descrita por Cajal en el año 1893 (Ramón y





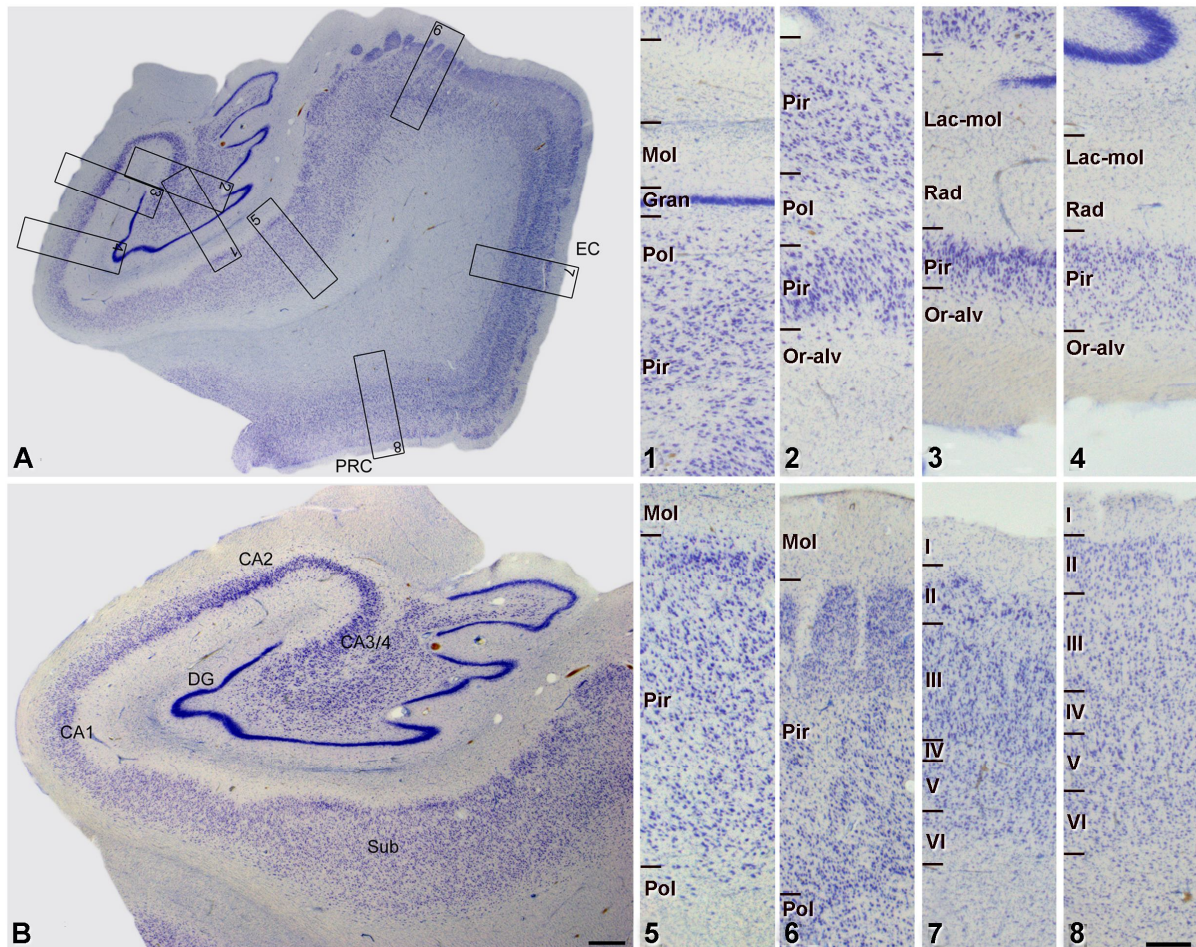
**Figura 8. Dibujo esquemático de la estructura y conexiones del hipocampo propio.** A, ganglio del polo occipital; B, subículo; C, asta de Ammón; D, fascia dentada; E, fimbria; F, cíngulo; G, paquete angular cruzado; H, cuerpo calloso; a, axones que penetran en el cíngulo; b, fibras singulares que terminan en el foco del polo occipital; c, fibras perforantes eseno-amónicas; d, fibras perforantes singulares; e, plano de las fibras eseno-amónicas superiores; g, células del subículo; h, células piramidales de la región superior del asta de Ammón; i, colaterales ascendentes de las células piramidales grandes; j, axón de una célula granular; r, colaterales de las fibras del estrato alveus. Tomado de Cajal (1899-1904).

Cajal, 1893). Presenta cinco estratos bien diferenciados que corresponden con la estructura trilaminada propia de esta corteza

(Duvernoy, 2005):

-*Alveus*: fascículo formado por los axones eferentes de las neuronas principales de CA





**Figura 9.** (A) Sección de la formación del hipocampo y corteza adyacente humana teñida con el método de Nissl (DG: giro dentado; Sub: subículo; CA1-3/4: campos amónicos; EC: corteza entorrinal; PRC: corteza perirrinal). Las áreas delimitadas por los rectángulos se muestran a mayor aumento en los paneles 1-8. (B) Mayor aumento de A mostrando diferentes regiones de la formación del hipocampo. (1-8), Mayor aumento de las áreas delimitadas en A que muestran las características citoarquitectónicas de las diferentes regiones de la formación del hipocampo y corteza adyacente. Mol, capa molecular; Gran, capa granular; Pol, capa polimórfica; Lac-mol, estrato lacunosum-molecular; Rad, estrato radiatum; Pir, estrato piramidal; Or-alv, estratos oriens y alveus. Barra de escala: A, 1200  $\mu\text{m}$ ; B, 720  $\mu\text{m}$ ; 1-8, 320  $\mu\text{m}$ . Modificada de DeFelipe *et al.*, (2007).

y del subículo, y por fibras aferentes de origen subcortical.

- *Stratum oriens*: contiene dendritas basales y axones de células piramidales, junto con neuronas polimórficas.

- *Stratum pyramidale*: contiene los somas de las células piramidales y sus dendritas basales. La mayoría de las neuronas hipocámpicas se encuentran en esta capa.

- *Stratum radiatum*: formado por las dendritas apicales de las células piramidales, los axones aferentes que contactan con ellas y algunas interneuronas.

- *Stratum lacunosum-molecular*: contiene las arborizaciones distales de las dendritas apicales de las células piramidales y fascículos axónicos que discurren paralelos a la cisura hipocámpica. Estos fascículos están formados principalmente por fibras perforantes procedentes de la corteza entorrinal. También pueden aparecer interneuronas.

Se considera que el *alveus* y el *stratum oriens* constituyen la capa polimórfica; el *stratum pyramidale* la capa celular y el *stratum radiatum* junto con el *lacunosum-molecular* la capa molecular (Ramón y Cajal

1911; Lorente de Nó, 1934).

#### **1.2.1.5 Conexiones de la formación del hipocampo**

La conexión básica en la formación del hipocampo (Figura 10) habitualmente se simplifica en la denominación de vía trisináptica (Andersen *et al.*, 1966) debido a que el hipocampo es considerado como un circuito básico trisináptico formado por la vía perforante, la vía musgosa y las colaterales de Shaffer (Schaffer, 1892). Actualmente en este esquema se incluyen otras conexiones por lo que algunos autores prefieren utilizar el término "polisináptico" (circuito o vía polisináptica del hipocampo; Duvernoy, 2005).

### **1.2.2 Corteza parahipocampal**

#### **1.2.2.1 Estructura y función**

En el hombre, la corteza parahipocampal (CPH) se encuentra formando parte del giro parahipocampal (Van Hoesen, 1995) o región parahipocampal, (Scharfman *et al.*, 2000; Figura 11). Este término ha sido utilizado de diferente forma por distintos autores debido a que es una región compleja que contiene distintas regiones citoarquitectónicas. En el presente trabajo seguiremos la clasificación seguida por Insausti y Amaral (2004) (Figura 11). Constituye la principal ruta de salida y entrada de información sensorial asociativa de la formación del hipocampo. En los últimos años el giro parahipocampal se ha dividido en dos partes, una anterior que está compuesta por la corteza entorrinal y la corteza perirrinal y una posterior constituida por la corteza parahipocampal posterior que incluye los campos TF (situado lateralmente) y TH (situado medialmente; Von Economo, 1929).

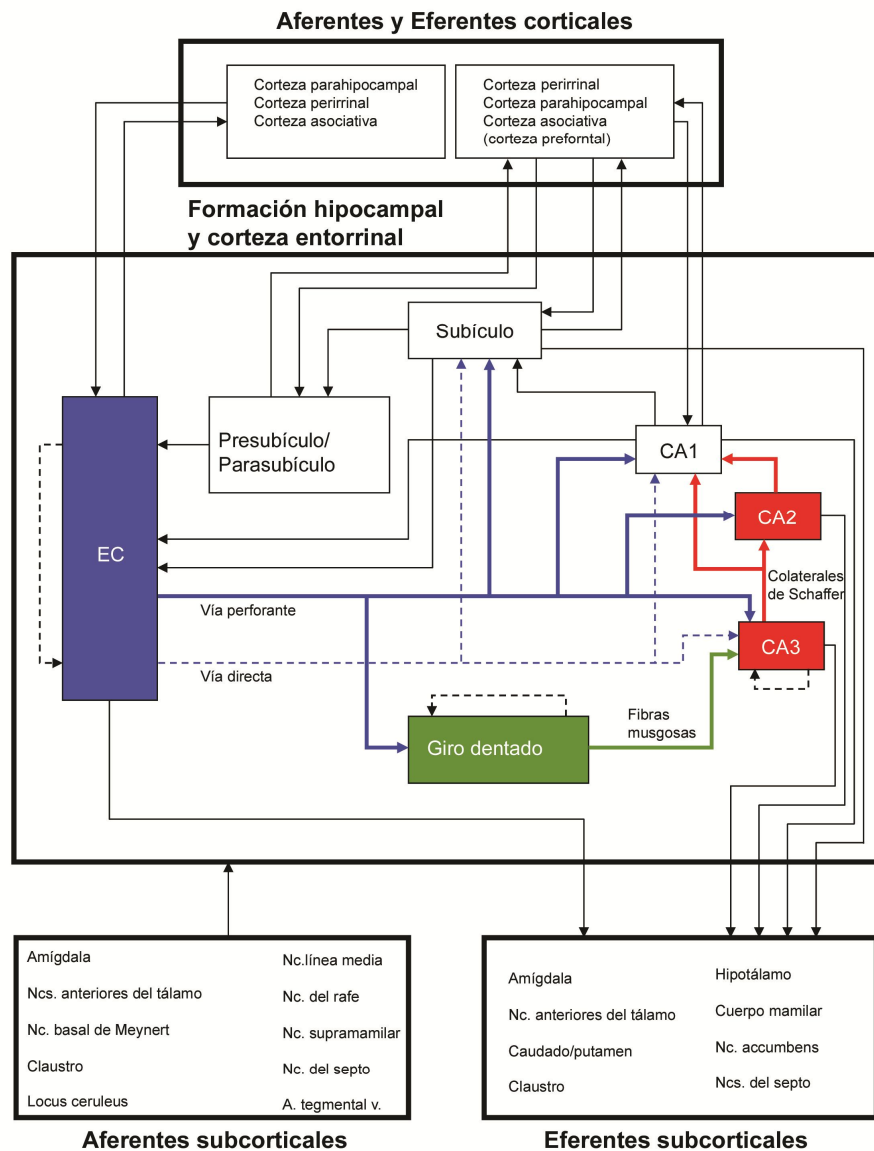
Actualmente se define la corteza perirrinal como las áreas 35 y 36 de Brodmann (Brodmann, 1909). El campo TH y el área 35

son agranulares, es decir, no presentan capa de células granulares (capa IV), la cual es evidente en el campo TF y área 36. Por esta razón algunos autores consideran a TH como la parte posterior del área 35 y TF como la continuación posterior del área 36 (Van Hoesen, 1982).

El campo TH se divide en el área THr (zona rostral) y THc (zona caudal). En THr, encontramos una capa celular V/VI formada por células grandes. Las capas II y III son delgadas y no hay límites claramente definidos entre ellas. El campo THc se distingue del THr por la presencia en la capa IV de células orientadas radialmente y con apariencia laminar. El campo TF está situado lateralmente adyacente a TH. TF se divide en TFm (zona medial) y TFl (zona lateral). En general TFm es más delgada que TFl, y existe una diferencia citoarquitectónica menor entre las capas V y VI (Suzuki y Amaral, 1994).

La corteza parahipocampal constituye citoarquitectónicamente una corteza de transición entre la allocorteza y la isocorteza y se ha sugerido que está implicada en funciones visuales y visuoespaciales (Suzuki y Amaral, 1994). Dentro de sus principales conexiones corticales encontramos que el campo TF recibe aferencias de las áreas visuales unimodales (incluyendo el área visual V4 y TEO), de la porción caudal del área visual asociativa TE y de la corteza parietal posterior. Emite proyecciones preferentemente al área visual V4 y a la corteza parietal posterior. TH, recibe aferencias de la región visual unimodal y parietal posterior. Se encuentra conectada con regiones unimodales auditivas que se encuentran en TF. Subcorticalmente el giro parahipocampal se encuentra interconectado con los ganglios basales y el tálamo (Van Hoesen *et al.*, 1981; Saint-Cyr *et al.*, 1990; Lavenex *et*





**Figura 10. Esquema de las principales conexiones intrínsecas de la formación del hipocampo y la corteza entorrinal (EC), así como de las principales conexiones aferentes y eferentes corticales y subcorticales.** Las líneas discontinuas en el giro dentado, CA3 y corteza entorrinal indican las conexiones entre diferentes regiones en cada una de las áreas. Basado principalmente en las revisiones de Gloor (1997) e Insausti y Amaral (2004). Tomada de DeFelipe *et al.*, 2007.

*al.*, 2001, 2002).

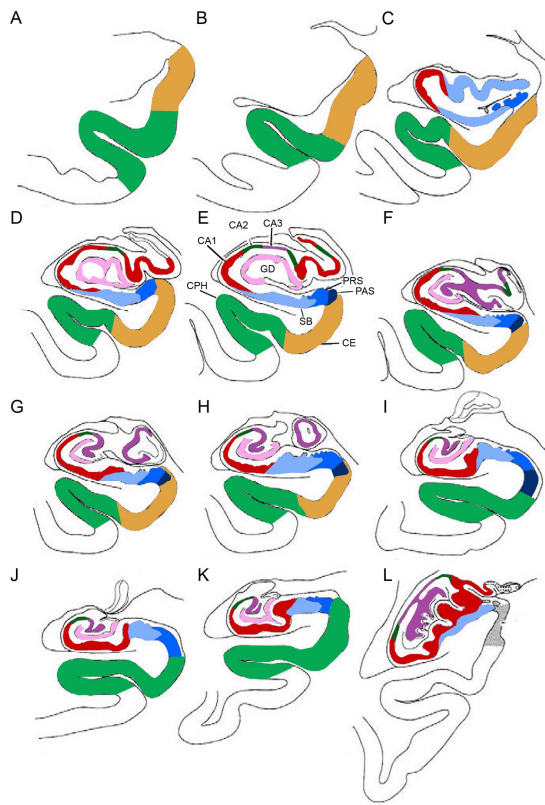
En el presente trabajo nos hemos centrado en la región TFI de la corteza parahipocampal y la denominaremos "CPH".

### 1.2.3 Amígdala lateral

#### 1.2.3.1 Estructura y función

Se encuentra formando parte del complejo amigdalino (Figura 12) que está cons-

tituido por un conjunto de núcleos situados en la región subcortical del lóbulo temporal, en su parte anteromedial. Está situada inmediatamente anterior a la formación del hipocampo y al extremo anterior del asta temporal. El complejo amigdalino es muy heterogéneo y no se considera una unidad funcional. Está recubierto de corteza rudimentaria y, posteriormente, se continúa con el



**Figura 11. Serie de secciones coronales del lóbulo temporal humano ordenados rostro-caudalmente (A-I).** Las distintas áreas citoarquitectónicas de la formación del hipocampo han sido coloreadas con distintos colores. CPH, corteza parahipocampal; PRS, presubículo; PAS, parasubículo; SB, subículo. CE, corteza entorrinal; GD, giro dentado. Modificado de Insausti y Amaral, 2004.

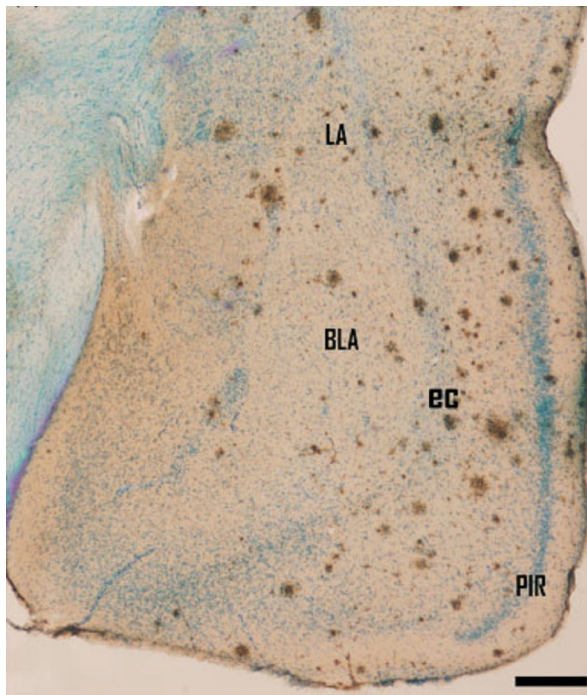
uncus del giro parahipocampal. No existe un acuerdo unánime con la denominación y clasificación de los núcleos; en el presente trabajo seguiremos la clasificación propuesta por Sims y Williams (1990). Las conexiones del complejo amigdalino, junto con diversos estudios clínicos y experimentales sugieren que es uno de los componentes clave en los circuitos centrales implicados en diversos aspectos del comportamiento, memoria y aprendizaje relacionados con la emoción, y más en concreto, aquellos relacionados con el miedo y la agresividad (Ledo-Varela *et al.* 2007). Por ejemplo, se ha comprobado que el núcleo lateral de la amígdala o amígdala lateral (AL) es una re-

gión clave en procesos de plasticidad relacionados con el aprendizaje asociado al miedo (Blair *et al.* 2001; Rodrigues *et al.* 2004). La AL recibe señales sensoriales procedentes del tálamo y de la corteza cerebral, y genera respuestas emocionales mediante la activación de diferentes regiones subcorticales (McDonald, 1998) a través de las neuronas de proyección o células principales de la AL.

El complejo amigdalino se encuentra atrofiado en numerosos procesos psiquiátricos, como son la demencia frontotemporal, esquizofrenia, autismo y EA (revisado en Ledo-Varela *et al.*, 2007). En pacientes con EA se ha observado una disminución del volumen (Jack *et al.*, 1997), pérdida neuronal y una notable gliosis (Vereecken *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1991). Esta atrofia se ha correlacionado con la alteración de la memoria emocional presentada en los pacientes de EA (Mori *et al.*, 1999).

#### 1.2.4 Sistema Límbico

El Sistema Límbico es un conjunto de estructuras anatómicas que trabajan funcionalmente en conjunto. Se encuentra formado por el lóbulo límbico (circunvolución del cuerpo calloso, la circunvolución subcallosa y el giro parahipocampal), formación del hipocampo, complejo amigdalino (corteza periamigdalina, núcleo amigdalino y estría terminal), área septal, formaciones olfatorias (bulbo, pedúnculo estría olfatoria y lóbulo piriforme), núcleo dorso mediano y núcleo anterior del tálamo óptico. El sistema límbico participa en el control y la expresión del estado anímico y las emociones, el procesamiento y almacenamiento de la memoria reciente, y el control del apetito y de las respuestas emocionales a la comida (procesos fisiológicos que promueven y determinan la supervivencia de las especies



**Figura 12.** Sección coronal de la región amigdalina inmunoteñida con anti-A $\beta$  y contrateñida con Nissl. BLA= núcleo basolateral de la amígdala; EC=cápsula externa; LA= núcleo lateral de la amígdala; PIR=Corteza piriforme. Barra de escala, 350  $\mu$ m.

en su medio ambiente). El sistema límbico también está asociado con el sistema neuroendocrino y el sistema nervioso autónomo.

### 1.2.5 Tipos de neuronas

En el año 1892, Cajal (Cajal, 1892), gracias al descubrimiento del método de Golgi (Golgi, 1873), clasificó las neuronas de la corteza cerebral en células de axón largo y células de axón corto (revisado en DeFelipe 2002). Desde entonces se utilizan los términos de células de axón largo o **neuronas de proyección** y células de axón corto o **inter-neuronas** para clasificar en general a las neuronas del sistema nervioso.

#### 1.2.5.1 Neuronas de proyección

Son las células más abundantes de la corteza cerebral, representando el 70-85% y el 90% de la población neuronal total en la neocorteza y en las regiones CA de la formación del hipocampo (DeFelipe y Fariñas,

1992; Sweatt, 2004). Dentro de las neuronas de proyección de la corteza cerebral, encontramos las células piramidales de la neocorteza, células piramidales del hipocampo, células piramidales de la corteza adyacente (corteza parahipocampal, corteza entorrinal y corteza perirrinal) y células granulares del GD (Figura 13). También existen células de proyección en regiones subcorticales como en la amígdala lateral del complejo amigdalino.

Las células de proyección se caracterizan morfológicamente por poseer un axón largo que proyecta a otros centros, por lo que también se conoce como células de axón largo. Son células excitadoras, utilizan glutamato como neurotransmisor y dan lugar a la mayor parte de las sinapsis excitadoras corticales (White, 1989; Jones, 1984; Lund, 1984; revisado en DeFelipe y Fariñas, 1992). También se caracterizan por presentar espinas dendríticas a lo largo de toda la superficie dendrítica, exceptuando el segmento más próximo al soma (Larkman, 1991; Alonso-Nanclares *et al.*, 2004; revisado en Elston y DeFelipe 2002).

A continuación se hará una breve descripción de las neuronas de proyección estudiadas en la presente tesis doctoral (Figura 13):

##### 1.2.5.1.1 Células piramidales de la CPH

Se caracterizan morfológicamente por poseer un cuerpo celular en forma piramidal u ovoide del que surge la dendrita apical que asciende hasta la superficie pial de la corteza, formando un penacho dendrítico terminal que puede alcanzar la capa I o la capa IV (Feldman, 1984). Las dendritas basales surgen radialmente desde el soma. Desde la base del soma surge un axón formado por el cono axónico y el segmento inicial del axón. El axón sigue un curso descendente hacia la sustancia blanca emitiendo numerosas cola-

terales locales (revisado en DeFelipe y Fariñas, 1992).

#### **1.2.5.1.2 Células piramidales de CA1**

Las neuronas piramidales se caracterizan por presentar un soma con forma cónica, del que parte una dendrita apical que atraviesa el *stratum radiatum* y termina en el *stratum lacunosum-moleculare*, y varias dendritas basales que en ciertas especies (por ejemplo, rata y ratón) se ramifican prácticamente de forma exclusiva en el *stratum oriens* mientras que en ciertos primates, una buena parte de la arborización dendrítica basal se distribuye en la capa piramidal. Los axones constituyen el *alveus* y salen del hipocampo por la fimbria y el fórnix, dirigiéndose principalmente hacia el *septum* (Duvernoy, 2005; Amaral y Lavenex, 2004).

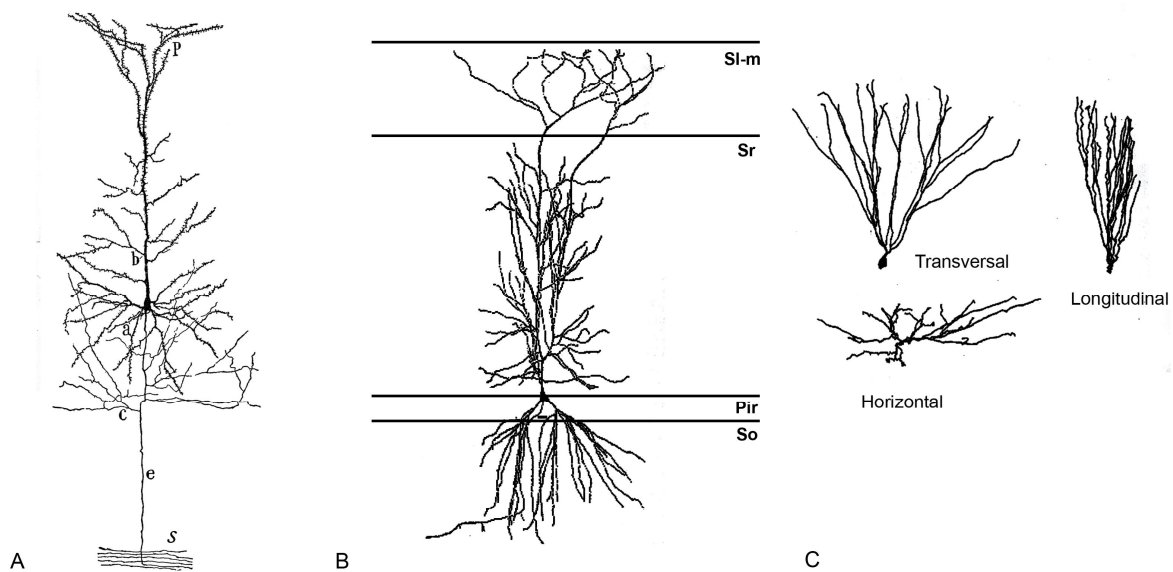
Las células piramidales de CA1 presentan gran homogeneidad en la organización de sus árboles dendríticos ya que mantienen una longitud dendrítica total y configuración dendrítica similar independientemente de donde se encuentren a lo largo de todo CA1 (Pyapali *et al.*, 1998). Son de menor tamaño que las células piramidales de CA3. Algunas células presentan solo una dendrita apical, mientras que otras presentan dos. Las células con dos dendritas apicales suelen tener mayor longitud dendrítica total en la dirección apical, mientras que las células con una sola dendrita apical tienden a tener mayores árboles dendríticos basales; por lo que, en general podemos decir que los árboles dendríticos de todas las neuronas de CA1 tienen la misma longitud dendrítica. Esta homogeneidad anatómica, a menudo, no se refleja en una homogeneidad funcional, porque existen diferentes localizaciones para las entradas de información desde la corteza entorrinal a lo largo de todo CA1 (Amaral y Lavenex, 2004).

#### **1.2.5.1.3 Células granulares del GD**

Representan el principal tipo neuronal del GD. Se caracterizan morfológicamente por presentar un cuerpo celular elíptico. Estos cuerpos se encuentran tan estrechamente empaquetados que en la mayoría de los casos no se encuentran células gliales entre ellos (Claiborne *et al.*, 1990). El árbol dendrítico de estas células, presenta una característica forma de cono con todas sus ramas orientadas hacia la porción superficial de la capa molecular; muchas de las partes distales del final del árbol dendrítico se encuentran en la fisura del hipocampo o en la superficie ventricular (Amaral y Lavenex, 2004). Las células granulares de la zona subventricular junto con las células del borde del ventrículo lateral constituyen las dos únicas zonas conocidas donde se produce neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos (Rakic, 2002).

#### **1.2.5.1.4 Células de proyección de la AL**

Constituyen las células principales de la AL. Representan el 70% de la población neuronal total en la AL (revisado en Sah *et al.*, 2003). Se han descrito como células piramidales (Hall *et al.*, 1972, Millhouse *et al.*, 1983, Washburn *et al.*, 1992), células espinosas o células de clase I (McDonald *et al.*, 1982; McDonald *et al.*, 1984). Se caracterizan morfológicamente por presentar cuerpos celulares de forma piramidal del que emergen 3-7 dendritas. A partir de las dendritas de 2º y 3º orden, éstas comienzan a presentar espinas dendríticas. Del conjunto de todas sus dendritas, una se distingue como más prominente que las otras, y a ésta se la considera como la dendrita apical (Faber *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 1972). En muchos casos estas células presentan dos dendritas apicales (McDonald *et al.*, 1992). Al contrario que ocurre en las neuronas piramidales de la



**Figura 13. Principales neuronas de proyección de la corteza cerebral.** (A) Dibujo esquemático de una célula piramidal típica realizado por Cajal. p, penacho dendrítico apical; d, dendrita apical; a, dendrita basal; c, colateral axónico; e, axón principal; s, fibras de la sustancia blanca. (B) Neurona piramidal de CA1 mostrando la disposición de árbol dendrítico a lo largo de los distintos estratos. SI-m: *stratum lacunosum-moleculare*; Sr: *stratum radiatum*; Pir: *capa de células piramidales*; So: *stratum oriens*. (C) Neurona granular representada en sección transversal, longitudinal y horizontal. Tomado (A) de DeFelipe, 1994 y (B y C) de Amaral y Lavenex, 2004.

corteza, la dendrita apical de las células principales de la AL no se dispone de forma paralela al resto de las dendritas, sino que se distribuye aparentemente al azar, sobre todo en la zona próxima a los bordes de los núcleos (Faber *et al.*, 2001; McDonald, 1992; Paré *et al.*, 1995; Rainnie. *et al.*, 1993; Washburn *et al.*, 1992). También se caracterizan morfológicamente por que las dendritas primarias basales y apicales presentan la misma longitud; todas sus dendritas se estrechan rápidamente y las dendritas distales no se encuentran ramificadas (Faber *et al.*, 2001; Larkman *et al.*, 1991). El axón de estas células surge desde el soma o desde la porción inicial de la dendrita (Faber *et al.*, 2001; McDonald, 1982), emitiendo numerosas ramificaciones colaterales a las células vecinas (McDonald, 1982; Smith *et al.*, 1994). La orientación de estas células no es homogénea y en secciones coronales, pueden parecer células estrelladas debido a que

tienen una orientación caudal (Faber *et al.*, 2001; Millhouse *et al.*, 1983; Paré *et al.*, 1995; Washburn *et al.*, 1992).

Las células principales de la AL, proyectan de forma difusa a la corteza prefrontal, cingular, insular y temporal inferior. Se ha sugerido que la misión de estas fibras sería la activación de estas zonas como respuesta a estímulos importantes desde el punto de vista conductual (Ledo-Varela *et al.*, 2007).

#### 1.2.5.2 Interneuronas

Se caracterizan morfológicamente por poseer un axón que se ramifica localmente, por lo que también se las conoce como células de axón corto o local. Representan el 15-30% de la población neuronal. Actualmente se las dividen según su morfología en:

- Células estrelladas con espinas dendríticas: presentan una morfología somato-dendrítica estrellada. Utilizan glutamato como neurotransmisor. Se encuentran principalmente en la capa IV.



-Células no piramidales sin espinas dendríticas: son la mayoría de las neuronas de axón local. Existe gran variedad de tipos morfológicos con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. Son células inhibitoras y utilizan mayoritariamente GABA como neurotransmisor (revisado en Ascoli *et al.*, 2008).

### 1.2.6 Espinas dendríticas

#### 1.2.6.1 Antecedentes históricos

Fueron descritas por Cajal por primera vez en el año 1888 (Figura 14). Las observó en las dendritas de las células de Purkinje utilizando el método de Golgi (Cajal, 1888). En el artículo se refería a ellas como “....La superficie.....aparece erizada de puntas o espinas cortas.....”

En una nota al pie de página Cajal escribió:

*“Al principio creíamos que estas eminencias eran resultado de una precipitación tumultuosa de la plata; pero la constancia de su existencia....nos indica a estimarlas como disposición normal”*

Este hallazgo trajo consigo gran controversia en el mundo científico. Algunos investigadores como Retzius (1891) y Schaffer (1892) apoyaron a Cajal, mientras que otros como Kölliker (1896) y Meyer (1896a,b, 1897) propusieron que eran artefactos de la tinción y por tanto negaban la existencia de estas estructuras. Esta controversia se debía en gran parte a que las espinas no eran observadas con otros métodos histoquímicos como el azul de Metileno, por lo que estos últimos autores atribuían su existencia a un artefacto propio del método de Golgi. En 1896 Cajal mejoró la técnica del azul de Metileno y corroboró la existencia de las espinas dendríticas (Figura 14B).

Posteriormente a estos descubrimientos, las espinas dendríticas permanecieron prácticamente en el olvido hasta que en la década de los 50 se describió a las espinas

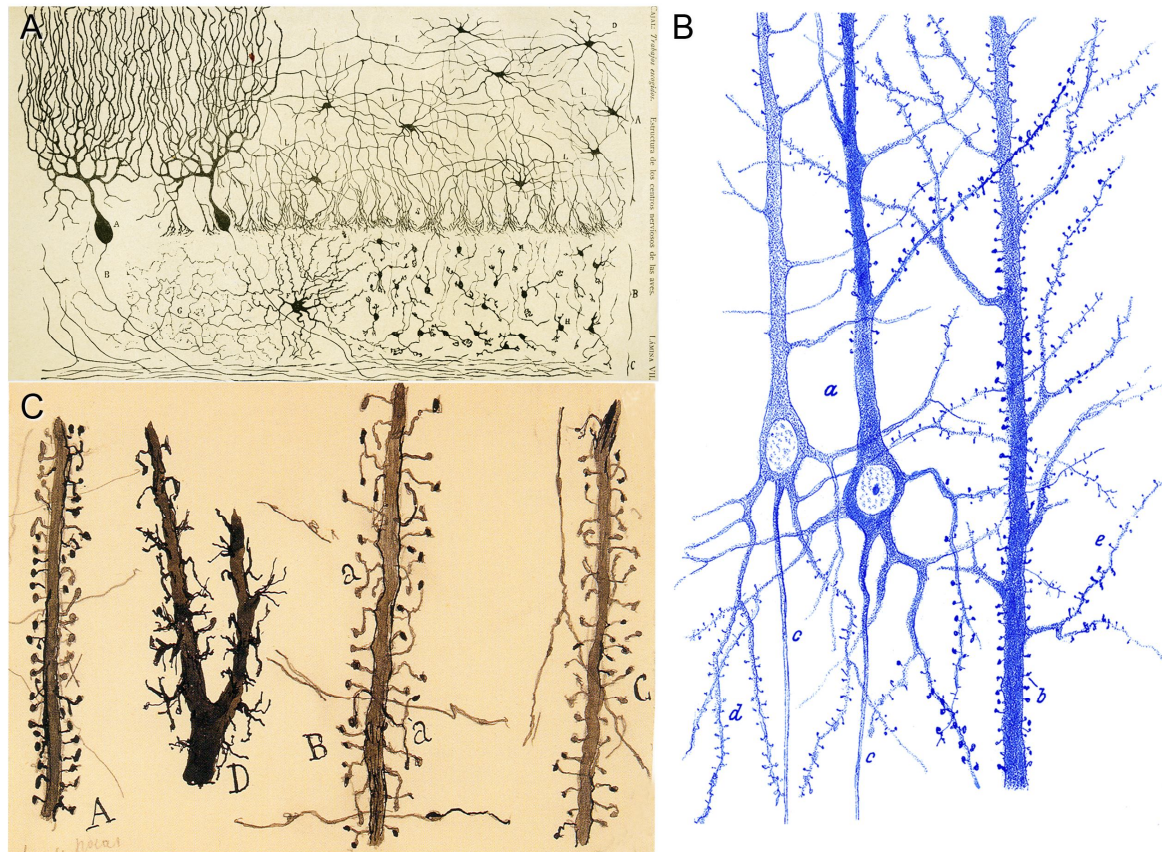
como el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras en la corteza cerebral (revisado en DeFelipe y Fariñas, 1992).

#### 1.2.6.2 Morfología y función

Hoy en día existen numerosos estudios sobre las espinas dendríticas, acerca de su morfología, distribución, estructura, función y la relación entre ambas; considerándolas un elemento clave en el funcionamiento de los circuitos corticales. Se encuentran a lo largo de toda la superficie celular, excepto en el soma y en las 10-20 micras más próximas a éste (revisado en Elston y DeFelipe 2002).

Las espinas dendríticas representan las principales dianas sinápticas de los axones excitadores (Gray, 1959; Figura 15), y estas sinapsis excitadoras representan la mayoría de las conexiones sinápticas en la corteza cerebral. Por otra parte, asumiendo la condición de que “1 espina =1 sinapsis excitadora” (Arellano *et al.*, 2007b), el número de espinas es, prácticamente, equivalente al número de sinapsis excitadoras que recibe, y por lo tanto este número refleja la capacidad para integrar y procesar la información excitadora que recibe la célula piramidal.

En cuanto a su morfología, Cajal hizo hincapié en la diversidad de formas que presentan y en algunos dibujos en los que Cajal dibuja las espinas detalladamente, se pueden clasificar, según los criterios de Peters y Kaiserman-Abramof (1970), en sésiles, con forma de champiñón y finas. Hoy en día se sabe que las espinas tienen una gran diversidad morfológica, existiendo gran número de formas intermedias. En una espina dendrítica típica podemos distinguir dos zonas bien diferenciadas: un cuello o tallo dendrítico que nace de la dendrita y un ensanchamiento en la parte distal de éste que se denomina cabeza, que es el lugar donde se establece el contacto sinápti-



**Figura 14. Dibujos de Ramón y Cajal mostrando la presencia de espinas dendríticas.** (A) Primer dibujo de Ramón y Cajal mostrando las espinas de las células de Purkinje de la gallina (Cajal, 1888). (B) Dibujo publicado por Cajal (1896) para mostrar células piramidales de la corteza de conejo adulto teñidas con azul de metileno. (C) Esquema realizado por Cajal para ilustrar distintos tipos de espinas de células pirámides. A, conejo; B, niño de dos meses; C, espinas de gato (región visual) de un mes; D, trozo de una dendrita medular del gato en una fase anterior a la formación de los "Endfüssen" (Cajal, 1933).

co en la mayoría de los casos. En el interior de la espinas encontramos el denominado aparato de la espinas, constituido por un conjunto de varias cisternas aplanadas y cuya función se relaciona con la regulación del flujo de calcio al interior de la espinas (revisado en Yuste y Bonhoefer, 2004).

Tanto la longitud del cuello como el volumen de la cabeza presentan tamaños muy variables, y estudios recientes indican que existe una relación directa entre la morfología de la espinas y las propiedades biofísicas de las sinapsis que establece, por lo que la morfología de las espinas dendríticas tiene una extraordinaria relevancia funcional (Arellano *et al.*, 2007a). Por ejemplo, se ha comprobado que el volumen de la cabeza es

directamente proporcional al tamaño de la densidad postsináptica y al número de receptores postsinápticos de tipo AMPA (Matsuzaki *et al.*, 2001), por lo que está directamente relacionado con las corrientes sinápticas excitadoras que se generan en las espinas. Además, el volumen de la cabeza también se encuentra directamente relacionado con el terminal presináptico, tanto con su tamaño, como con el número de vesículas presinápticas que contienen el neurotransmisor dispuesto a liberarse (Spacek y Hartmann, 1983; Harris y Stevens, 1988; Schikorski y Stevens, 2001). Finalmente, el cuello de la espinas constituye una barrera para la difusión de calcio y otros metabolitos y

aísla químicamente a la cabeza de la espina de la dendrita (Majewska *et al.*, 2000, Yuste y Majewska, 2001), por lo que variaciones en su morfología afectan a las propiedades biofísicas de la transmisión glutamatérgica.

En resumen, los cambios en el número de espinas dendríticas sugieren modificaciones en el número de sinapsis excitadoras que reciben, mientras que los cambios en su morfología sugieren modificaciones funcionales en los mecanismos de procesamiento de la información a nivel de la espina.

Por otra parte, se piensa que las espinas dendríticas actúan como unidades de memoria, de tal forma que las espinas grandes serían estables y representarían las trazas físicas de la memoria a largo plazo, contribuyendo a las conexiones sinápticas estables ("espinas de memoria"), mientras que las espinas pequeñas serían móviles e inestables y contribuirían a las conexiones débiles ("espinas de aprendizaje") (Kasai *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2004; Spruston, 2008; Kasai *et al.*, 2010; Yuste R, 2010). Por consiguiente, el estudio de las espinas dendríticas constituye una de las líneas principales de investigación en el ámbito de la neurociencia.

#### **1.2.6.3 Espinas dendríticas en estados patológicos**

A lo largo de la historia, se ha descrito la presencia de alteraciones de las espinas dendríticas (reducción en el número de espinas y cambios en su morfología) como el correlato anatómico más importante en diversos tipos de patologías cerebrales y enfermedades mentales (depresión, esquizofrenia, epilepsia, tumores, lesiones traumáticas, alcoholismo, abuso de drogas, síndrome de Down, Parkinson, Huntington y Alzheimer; revisado en Fiala, 2002; Figura 16). La primera alteración morfológica de las espinas dendríticas que se describió como consecuencia de un estado patológico fue el es-

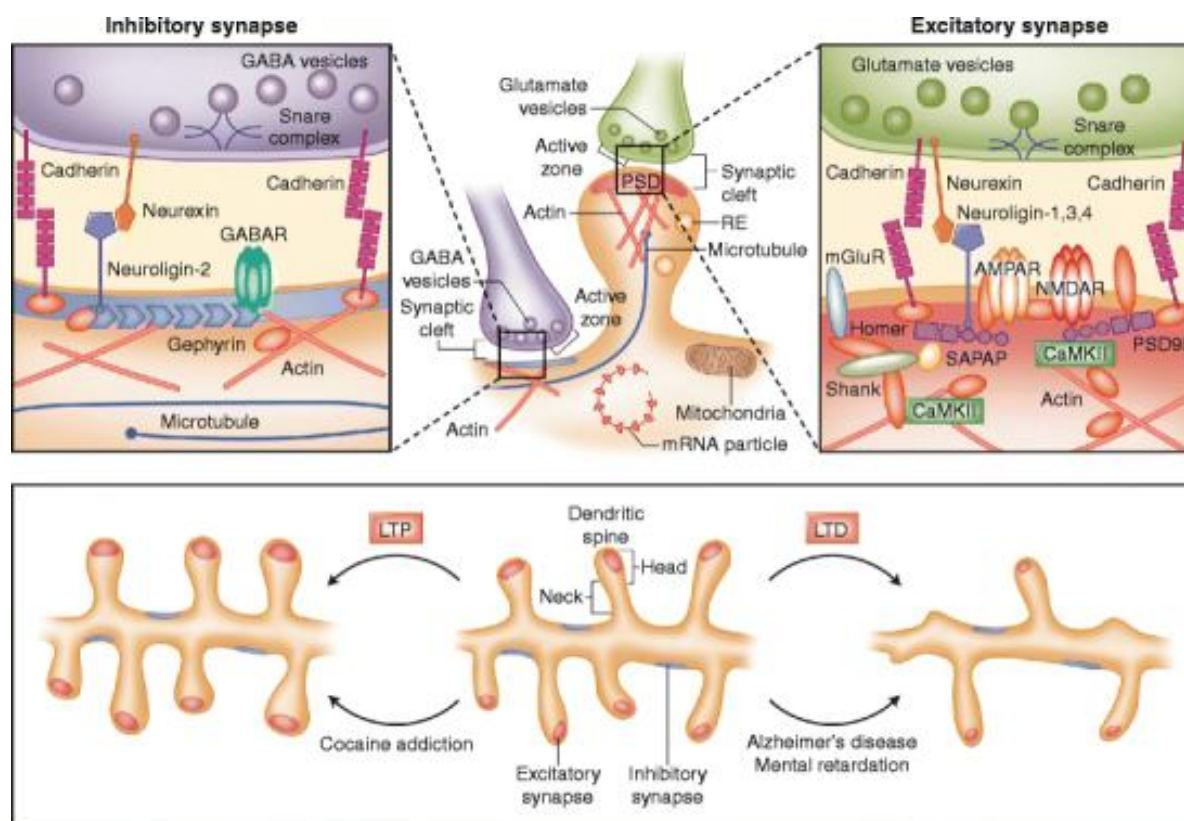
tado monoliforme o degeneración varicosa. Esta consiste en la formación de abultamientos o varicosidades a lo largo de las dendritas y la desaparición de las espinas. Este tipo de alteración se describió para diversas patologías como Corea (Golgi, 1877), parálisis general (Colella, 1892), embolismo e inanición (Monti, 1895a,b). Posteriormente se ha observado que existe un aumento de volumen y pérdida de espinas en otras patologías como epilepsia, hipoxia, isquemia, lesión traumática, edema, envenenamiento, abuso de alcohol y excitotoxicidad aguda (revisado en Fiala, 2002).

Marín-Padilla (1972), utilizando el método de Golgi (Figura 17), estudió la corteza motora de una niña de 13 años con síndrome de Patau. Encontró que las espinas eran irregulares, largas y tortuosas. También estudió la corteza motora de una niña de 18 años con síndrome de Down. En este caso las espinas aparecían con tres patrones distintos de alteraciones: las dendritas aparecían cubiertas de apéndices largos y tortuosos; otras aparecían uniformemente cubiertas con espinas delgadas, cortas y anormalmente pequeñas y un tercer tipo tenía pocas espinas dendríticas con cuellos y cabezas muy grandes. Posteriormente, Púrpura (1974), utilizando también el método de Golgi, observó una reducción del número de espinas y espinas con cuellos y cabezas muy grandes en niños con deficiencia mental.

#### **1.2.6.4 Espinas dendríticas en la enfermedad de Alzheimer**

Las espinas dendríticas en la EA, al igual que en otros estados patológicos (*vid.* § 1.2.6.3), se encuentran alteradas morfológicamente. La mayoría de los estudios realizados en material humano han sido realizados con el método de Golgi (Probst *et al.*, 1983, Scheibel *et al.*, 1978; Ferrer *et al.*, 1990a;





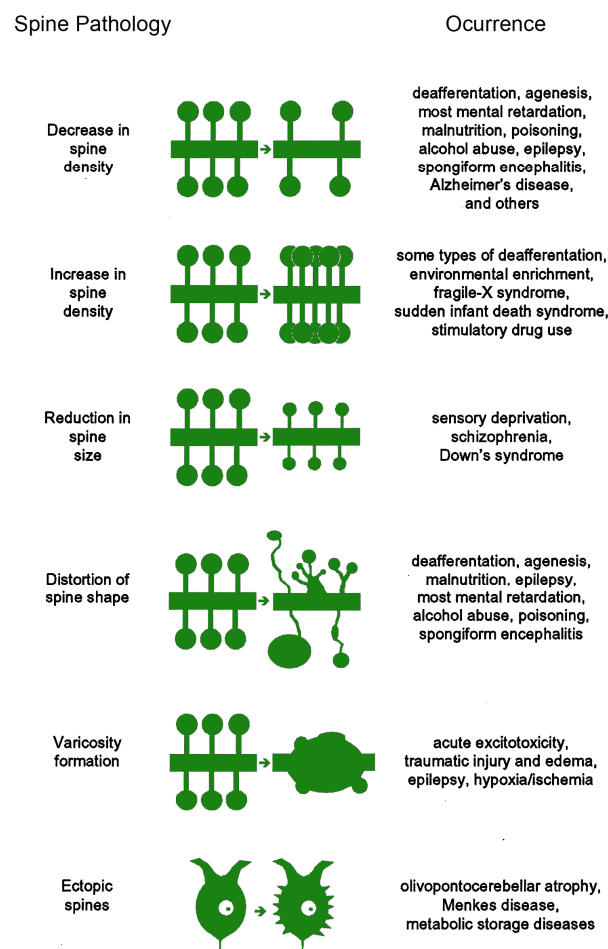
**Figura 15. Arquitectura molecular de las sinapsis inhibitorias y excitadoras.** Las figuras de arriba muestran sinapsis excitadoras e inhibitorias. Las sinapsis excitadoras presentan una prominente densidad postsináptica (PSD) y las dianas son principalmente espinas dendríticas. Las sinapsis inhibitorias muestran una PSD poco prominente y se establecen principalmente con el tallo dendrítico. Diversos orgánulos forman parte del complejo sináptico: las mitocondrias producen energía, las partículas de RNA y polirribosomas permiten la síntesis local de proteínas, el retículo endoplasmático (RE) internaliza el transporte de receptores sinápticos hacia la membrana plasmática, y el citoesqueleto regula la forma de la espina. La actina del citoesqueleto está asociada con la PSD y es determinante para la forma de la espina y su movilidad. La microanatomía de las sinapsis excitadoras e inhibitorias y la interacción entre sus proteínas está descrita en los dibujos de arriba de la derecha y la izquierda respectivamente. Se muestran las principales familias de las proteínas postsinápticas, incluyendo las proteínas de anclaje, moléculas de adhesión y receptores. Los dibujos de la parte inferior muestran los principales eventos morfológicos que ocurren en las espinas dendríticas tras la potenciación y depresión duradera (LTP y LTD, respectivamente). Los cambios morfológicos y moleculares que ocurren en las sinapsis son fundamentales en las alteraciones patológicas y son responsables de las alteraciones cognitivas en diversos desórdenes psiquiátricos. *CamKII*—Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-dependente de quinasa II; *AMPA*—receptor 3-amino 5-hidroxi metil-4-isoazolepropionato; *GABA*—ácido γ-aminobutírico; *GABAR*—receptor GABA; *NMDAR*—receptor N-metil-D-aspartato; *mGluR*—receptor metabotrópico de glutamato; *SAPAP*—proteína asociada a sinapsis-; *PSD-95*, proteína asociada a sinapsis. Tomada de Spronsen y Hoogenraad (2010).

Ferrer *et al.*, 1990b; Ferrer *et al.*, 1983). Este método presenta muchos inconvenientes debido a que solo marca al azar aproximadamente el 1% de las neuronas totales y no se puede combinar con otros marcajes inmunohistoquímicos. Por lo que, es considerado como un método incompleto e inconsistente que no permite realizar análisis cuantitativos rigurosos.

En estos estudios, se ha descrito dismi-

nución de la densidad de espinas y una serie de alteraciones morfológicas en forma de varicosidades y brotes en los segmentos dendríticos y axónicos en cerebros de enfermos de EA (Probst *et al.*, 1983, Scheibel *et al.*, 1978 Grutzendler *et al.*, 2007, Ferrer *et al.*, 1990a; Ferrer *et al.*, 1990b; Ferrer *et al.*, 1983).

Por otra parte, el uso de modelos transgénicos para estudios de enfermedades neu-

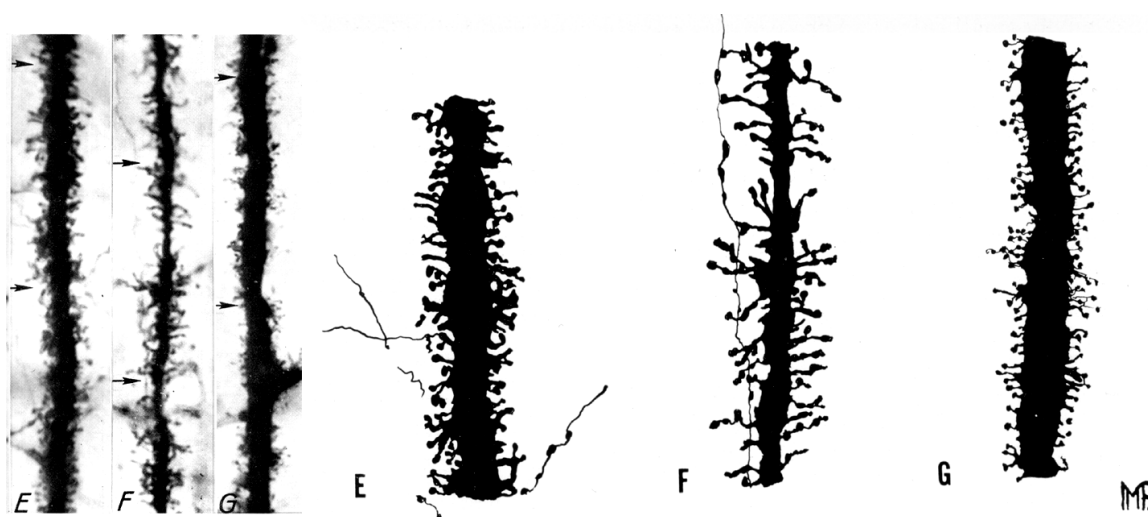


**Figura 16. Esquema de diferentes alteraciones de espinas dendríticas en distintas patologías.** Modificado de Fiala *et al.*, 2004.

rodegenerativas, como la EA, se encuentra muy extendido. Existen estudios en el hipocampo de modelos murinos transgénicos para la EA que muestran que las placas de A $\beta$  producen alteraciones en segmentos dendríticos y axónicos que se encuentran en contacto con ellas. Muestran una disminución de la densidad de espinas en los segmentos dendríticos y una serie de alteraciones morfológicas que consisten en la formación de varicosidades y brotes en los segmentos dendríticos y axónicos (Phinney *et al.*, 1999 Moolman *et al.*, 2004; Spire *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2004; Grutzendeler *et al.*, 2007). Las técnicas utilizadas en estos estu-

dios para visualizar a las neuronas cercanas a las placas consiste principalmente en su marcaje con diversas técnicas (uso de trazadores, virus portador de GFP y colorantes lipofílicos DiO) que, al igual que ocurre con el método de Golgi, presentan limitaciones con respecto a los análisis cuantitativos puesto que el número de neuronas marcadas es relativamente bajo.

Con respecto al papel del PHF-tau en las espinas dendríticas se sabe que la proteína tau no se encuentra en las espinas en el cerebro normal, pero se ha sugerido una interacción directa entre PHF-tau y F-actina (Fulga *et al.*, 2007), componente principal



**Figura 17. Detalles de dendritas apicales de células piramidales gigantes de la capa V de la corteza motora humana teñida con el método de Golgi.** Todas las microfotografías fueron tomadas en la capa III con el mismo aumento. (E) niño normal de 8 meses de edad. (F) niña recién nacida con síndrome de Patau. (G) niña de 18 meses de edad con síndrome de Down. Los dibujos de la derecha (E, F, G) están realizados con la cámara clara de las dendritas mostradas en E, F y G respectivamente. Nótese las alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas en los niños con síndrome de Patau y de Down. Tomada de Marín-Padilla, 1972.

del citoesqueleto de las espinas dendríticas (Hering y Sheng, 2001). De este modo se ha propuesto que PHF-tau puede inducir la acumulación de F-actina, provocando degeneración en las espinas dendríticas (Fulga et al., 2007).

Por otro lado, estudios recientes en modelos de ratón para la EA han observado que la fosforilación de PHF-tau<sub>AT8</sub> puede inducir que la proteína PHF-tau se localice de forma anormal en las espinas dendríticas, provocando una pérdida de receptores de glutamato y por lo tanto, una alteración de la transmisión sináptica excitadora (Hoover et al., 2010). Otros estudios muestran que la proteína PHF-tau en las espinas dendríticas puede asociarse al complejo PSD, incrementando en esta región el número de receptores de NMDA, dando lugar a una alteración de la transmisión sináptica en estas espinas. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se realiza un análisis de la microanatomía de las neuronas que presentan PHF-tau.

Por estos motivos, en la presente tesis doctoral se ha utilizado la técnica de las inyecciones intracelulares que permite seleccionar a las neuronas que se desean estudiar, marcar un gran número de células en un periodo de tiempo relativamente corto y combinar la técnica con marcaje inmunocitoquímico. Para el estudio de la patología amiloide hemos utilizado el modelo murino transgénico APP/PS1 y nos hemos centrado en las neuronas que se encontraban cerca de las placas de A $\beta$ , con el fin de estudiar las posibles alteraciones microanatómicas de las neuronas cuando se encontraban en contacto con ellas. Para el estudio de la patología neurofibrilar hemos utilizado tejido humano de un enfermo de Alzheimer, y nos hemos centrado en las neuronas que presentaban PHF-tau que no están en contacto con las placas de A $\beta$ . La microanatomía de estas neuronas la hemos comparado con neuronas vecinas que no presentaban PHF-tau.



## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente tesis doctoral es avanzar en el conocimiento de las posibles alteraciones microanatómicas de las células piramidales de la corteza cerebral y de las células de proyección de la amígdala lateral en la EA.

En concreto, nos planteamos los siguientes objetivos en relación a la patología amiloide y neurofibrilar:

### 1. **PATOLOGÍA AMILOIDE:** modelo transgénico APP/PS1.

#### Amígdala lateral (AL):

- 1a. Evaluar las posibles alteraciones en la AL, durante la realización del test de condicionamiento al miedo mediante estímulos auditivos (CMA).
- 1b. Analizar la complejidad del árbol dendrítico en las neuronas principales de la AL.
- 1c. Calcular la densidad neuronal en la AL.
- 1d. Calcular el porcentaje de volumen ocupado por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total de la AL.
- 1e. Analizar las posibles alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas de las células principales de la AL en función de su relación con las placas A $\beta$ . Más concretamente, estudiar la densidad de espinas, el volumen de sus cabezas y la longitud de sus cuellos a lo largo de la dendrita y en relación a su proximidad a las placas A $\beta$ .

#### Formación del hipocampo (giro dentado, GD; y CA1):

- 1f. Calcular el porcentaje de volumen ocupado por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total del GD y de CA1.
- 1g. Analizar las posibles alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas de las neuronas de la capa granular del GD y de las células piramidales de CA1 en función de su relación con las placas A $\beta$ : estudiar la densidad de espinas, el volumen de sus cabezas y la longitud de sus cuellos a lo largo de la dendrita y en relación a su proximidad a las placas A $\beta$ .

### 2. **PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR:** paciente con enfermedad de Alzheimer.

#### Corteza parahipocampal (CPH) e hipocampo (CA1):

- 2a. Calcular el porcentaje de volumen ocupado por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total de la capa III de la CPH y de CA1.
- 2b. Calcular el porcentaje de neuronas inmunoreactivas para PHF-tau<sub>AT8</sub> (PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir) y para PHF-tau<sub>PHF1</sub> (PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir) con respecto a la densidad neuronal total de la capa III de la CPH y de CA1.
- 2c. Analizar las posibles alteraciones morfológicas de las dendritas y de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub> de la capa III de la CPH y de CA1. Más concretamente, estudiamos el diámetro dendrítico, la densidad de espinas, el volumen de las espinas y la longitud las mismas, a lo largo de la dendrita y en relación con los distintos tipos de patrones de marcaje PHF-tau<sub>AT8</sub>.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### III MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1 Estudios de comportamiento

**3.1.1.1 Animales.** Para los estudios de comportamiento se utilizaron ratones macho (*Mus musculus*, cepa B6C3-Tg 85DBo/J) de edad comprendida entre 12-14 meses, diferente al grupo utilizado en los estudios de morfología (Tg-; n= 7, APP/PS1; n= 6). Todos los test de comportamiento fueron realizados entre 09:00 am y 14:30 pm. Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas establecidas en la Directiva Comunitaria Europea sobre animales de experimentación (86/609/EEC). Todos los experimentos fueron realizados a ciegas y por el mismo investigador.

**3.1.1.2 Laberinto en cruz elevado.** El laberinto en cruz elevado consiste en un aparato compuesto por dos brazos abiertos opuestos (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados opuestos (30 x 5 x 15 cm) que están conectados por un cuadrado central abierto (5 x 5 cm) sujetado por un eje central que mantiene a la estructura elevada del suelo.

El comportamiento de los animales se grabó usando una cámara de video y un sistema computerizado (Ethovision 1.90, Noldus IT, Wageningen, Holanda). El comportamiento se clasificó como: entradas en el brazo abierto y entradas en el brazo cerrado (se consideró que el animal estaba dentro cuando tenía sus cuatro patas dentro del brazo); distancia recorrida en el laberinto; y el tiempo utilizado en los brazos abiertos y cerrados.

**3.1.1.3 Condicionamiento al miedo mediante estímulos auditivos (CMA).** Para el test se utilizaron dos cajas de condicionamiento idénticas (30 x 37 x 25 cm) y cada ratón fue entrenado en una de las dos cajas. Los animales se colocaron individualmente en cada

caja, en parejas procedentes de la misma jaula.

El día del condicionamiento cada ratón se colocó a en su caja correspondiente y se le permitió explorarla durante 2 minutos, tras lo cual recibieron un tono (2.000 Hz y 85 dB de intensidad) durante 30 segundos como estímulo condicionado. Tras este estímulo recibieron un shock eléctrico (0,75 mA de intensidad) durante 2 segundos como estímulo incondicionado. El tono y el shock eléctrico se repitieron 3 veces consecutivas. Los animales permanecieron en las cajas de condicionamiento tras el último shock durante 30 segundos.

La fuerza de la asociación entre el estímulo condicionado y el no condicionado se evaluó 48 horas después de las sesiones de condicionamiento, usando un contexto distinto (las mismas cajas pero con diferentes paredes, suelo y olor). Se introdujeron los animales en sus jaulas correspondientes y tras 2 minutos sin ningún estímulo se re-expusieron los animales a un tono durante 3 minutos (usando las mismas características que durante el condicionamiento) pero en ausencia de shock eléctrico.

**3.1.1.4 Umbral de dolor.** Una semana después del condicionamiento, cada ratón fue individualmente colocado en una caja de condicionamiento distinta a la usada durante el test de condicionamiento al miedo mediante estímulos auditivos. Tras 120 segundos en la caja, se le aplicó una corriente eléctrica que fue gradualmente incrementándose en 0,05 mA/20 seg, hasta que los animales mostraron síntomas de disconformidad (moviéndose hacia atrás y sacudiendo sus patas traseras) y dolor (saltando). En ese momento la corriente fue inmediatamente detenida, y se asumió la corriente correspondiente como medida del umbral de dolor/disconformidad del animal.

### 3.1.2 Tejido procedente del modelo murino transgénico APP/PS1

En la presente tesis doctoral para el estudio de la patología amiloide en la EA, hemos utilizado el modelo murino transgénico APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup> (B6C3-Tg 85DBo/J) que expresa una mutación del gen de la proteína precursora amiloide humana (Mo/HuAPP695<sup>swe</sup>) y un mutante para el gen de la presenilina 1 humana (PS1-dE9) en neuronas del sistema nervioso central (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU) (Scheuner *et al.*, 1996). Se utilizaron ratones machos de edad comprendida entre 12 y 14 meses, debido a que, en esta edad, este modelo presenta numerosas placas de A $\beta$  y deterioro cognitivo (Malm *et al.*, 2007). Como animales controles Tg-, se utilizaron ratones de la misma camada de la misma edad y sexo, sin la presencia de los transgenes, y sometidos a las mismas condiciones ambientales.

Los ratones controles (Tg-) y ratones APP/PS1 fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal letal de pentobarbital (0,04 mg/kg) y se fijó el encéfalo mediante perfusión con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB) a través de la aorta ascendente, utilizando una bomba peristáltica (volumen final por animal: 80-100 ml).

Una vez extraído el encéfalo se sumergió inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PB y a continuación se seleccionaron pequeños bloques (aproximadamente 7x7x7 mm) que contenían las regiones de GD y CA1 de la formación del hipocampo y la región AL de la amígdala. Estos bloques se post-fijaron mediante inmersión en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4°C.

### 3.1.3 Tejido humano para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Los cerebros de pacientes con EA (n=4) fueron proporcionados por el Institut de Neuropatologia (Dr. Isidro Ferrer, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, España) y por el Banco de tejidos de la Fundación CIEN (Dr. Alberto Rábano, Área de Neuropatología, Centro de Alzheimer, Fundación Reina Sofía). El tiempo *post mortem* fue inferior a tres horas en todos los casos. Una vez extraído el encéfalo se sumergió inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PB y a continuación se obtuvieron pequeños bloques (aproximadamente 10x10x10 mm) de distintas regiones de la corteza cerebral que se post-fijaron mediante inmersión en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4°C.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Tinción con el método de Nissl

Los bloques de tejido cerebral se cortaron con un vibratomo para obtener secciones coronales de 50  $\mu$ m de grosor, y 5-6 secciones por caso fueron utilizadas para teñirlas con el método de Nissl (Figura 19A, 20A, 20E) de la siguiente manera: las secciones se dejaron secar en portas gelatinizados durante 48 horas a temperatura ambiente y posteriormente se tiñeron con una solución de Azul de Toluidina al 1% (13,72g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 12,90g de ácido cítrico en 1000cc de dH<sub>2</sub>O y 1g de Azul de Toluidina) durante 15 minutos y se aclararon en dH<sub>2</sub>O (3x5 minutos). Seguidamente se realizó una deshidratación con una concentración creciente de alcohol (ETOH 70%, ETOH 90%, ETOH 99% durante 2 minutos cada paso) y una clarificación con Xileno (5 minutos). A continuación las secciones se rehidrataron

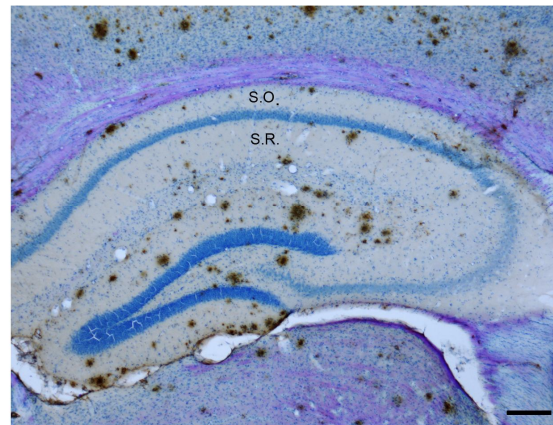
(ETOH 99%, ETOH 96% durante 2 minutos cada uno) y se lavaron con dH<sub>2</sub>O durante 2 minutos. Tras este ciclo de tinción, las secciones se volvieron a teñir con Azul de Toluidina de la misma manera excepto por la deshidratación que se realizó de la siguiente manera: ETOH al 50%, ETOH 70%, durante 30 segundos cada paso, ETOH 96% durante 1,5 minutos y ETOH 99% durante 5 minutos. Después, las secciones se clarificaron en Xileno (7 minutos) y se montaron con el medio de montaje DPX (Fluka AG, Buchs, Suiza).

### 3.2.2 Inyecciones intracelulares

#### 3.2.2.1 Modelo APP/PS1.

Las inyecciones intracelulares se realizaron en la formación del hipocampo y en la región AL de la amígdala de 15 ratones Tg- y 16 ratones APP/PS1.

Tras la fijación, el hemisferio izquierdo se cortó con un vibratomo en secciones coronales de 150  $\mu\text{m}$  de grosor. Las secciones fueron teñidas con DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) para la visualización de los núcleos celulares. En dichas secciones, se inyectó intracelularmente un total de 235 neuronas granulares en ratones Tg- y 462 neuronas granulares en ratones APP/PS1 en el giro dentado (GD); 270 neuronas piramidales en ratones Tg- y 262 neuronas piramidales en ratones APP/PS1 en CA1 y 135 neuronas principales en ratones Tg- y 143 neuronas principales en ratones APP/PS1 en el núcleo lateral de la amígdala (AL) con Alexa594 (Invitrogen, Eugene, OR), mediante la aplicación de corriente constante hiperpolarizante con un electrodo (0,5 a -1,0 nA). La corriente se aplicó hasta que los extremos distales de las dendritas mostraron una fluorescencia brillante.

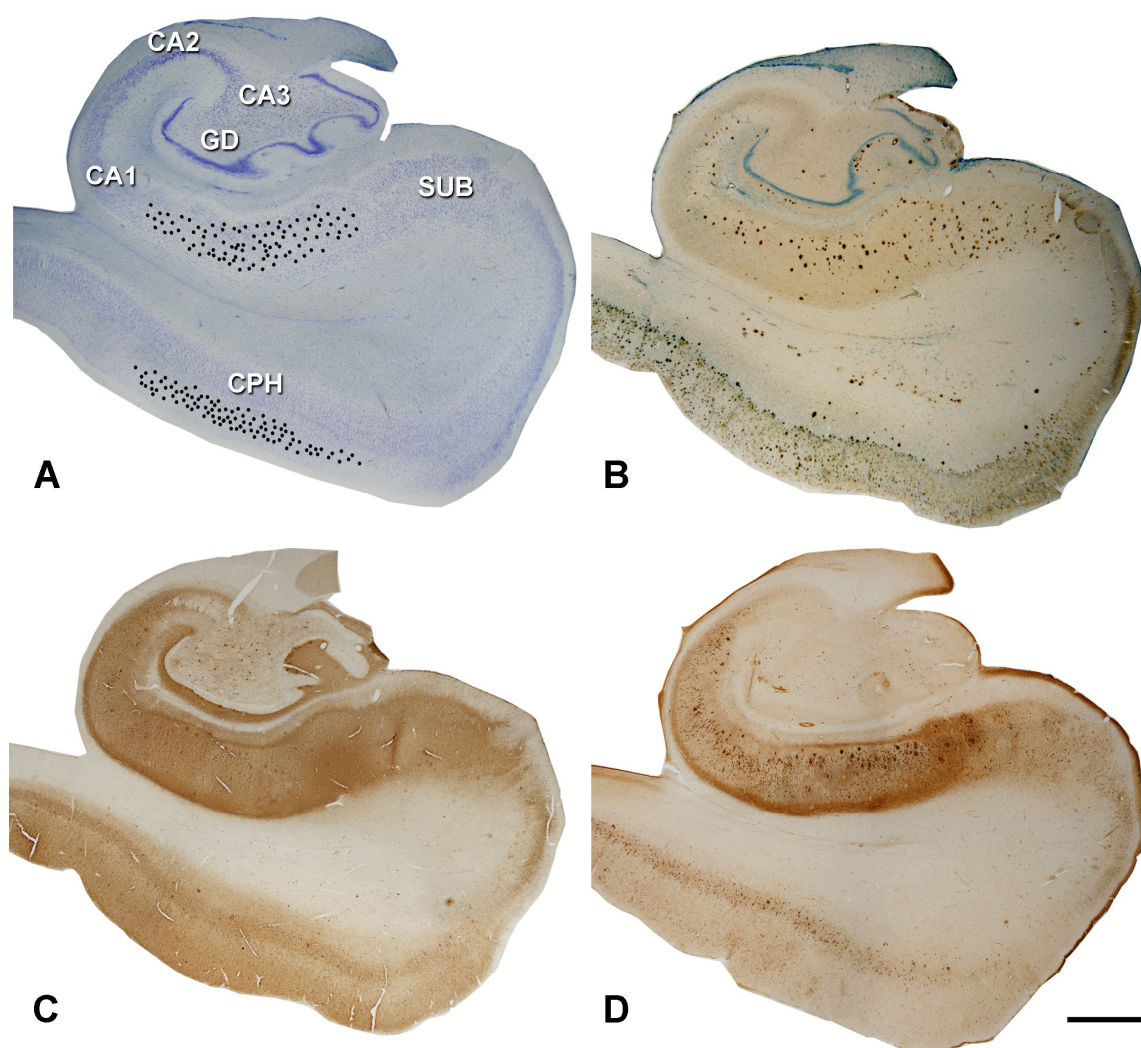


**Figura 18.** Fotografía panorámica tomada de un hipocampo de ratón APP/PS1 marcada con el anticuerpo anti-A $\beta$  humano y contrateñido con el método de Nissl. S.O., *stratum oriens*; S.R., *stratum radiatum*. Barra de escala, 300  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2.2.2 Material humano

Las inyecciones intracelulares se realizaron en la formación del hipocampo, corteza adyacente (entorrinal y parahipocámpica) y neocorteza (corteza cingular y temporal) de cuatro pacientes con EA. Sin embargo, solamente en un caso pudimos obtener un número razonable de neuronas inyectadas intracelularmente con una buena calidad. Este paciente (IF11) era un varón que había fallecido por fallo cardíaco a los 82 años de edad y que presentaba un estadio V/C de Braak.

Tras la fijación por inmersión, se obtuvieron secciones coronales de 250  $\mu\text{m}$  de grosor con un vibratomo. Las secciones fueron teñidas con DAPI para la visualización de los núcleos celulares. En dichas secciones se inyectaron 96 neuronas piramidales en la capa III de la corteza parahipocámpica (CPH) y 40 neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo. Las inyecciones se realizaron con Lucifer Yellow (LY; 8% en tampón Tris 0,1 M, pH 7,4) mediante la aplicación de corriente constante hiperpolarizante con un electrodo (0,5 a -1,0 nA). La corriente se aplicó hasta que los extremos distales de las dendritas mostraron una fluorescencia bri-



**Figura 19.** (A-D) Fotografías panorámicas de la formación del hipocampo del paciente IF11, teñidas con (A) el método de Nissl, (B) A $\beta$ /Nissl, (C) PHF-tau<sub>AT8</sub> y (D) PHF-tau<sub>PHF-1</sub>. Los puntos negros en A indican la localización aproximada de las neuronas inyectadas intracelularmente en la capa III de la corteza parahipocampal (CPH) y en la capa piramidal de CA1. Se puede observar un mayor aumento de las imágenes A-D en la figura 20. Barra de escala, 1000 $\mu$ m.

llante.

### 3.2.3 Inmunocitoquímica

#### 3.2.3.1 Marcaje simple

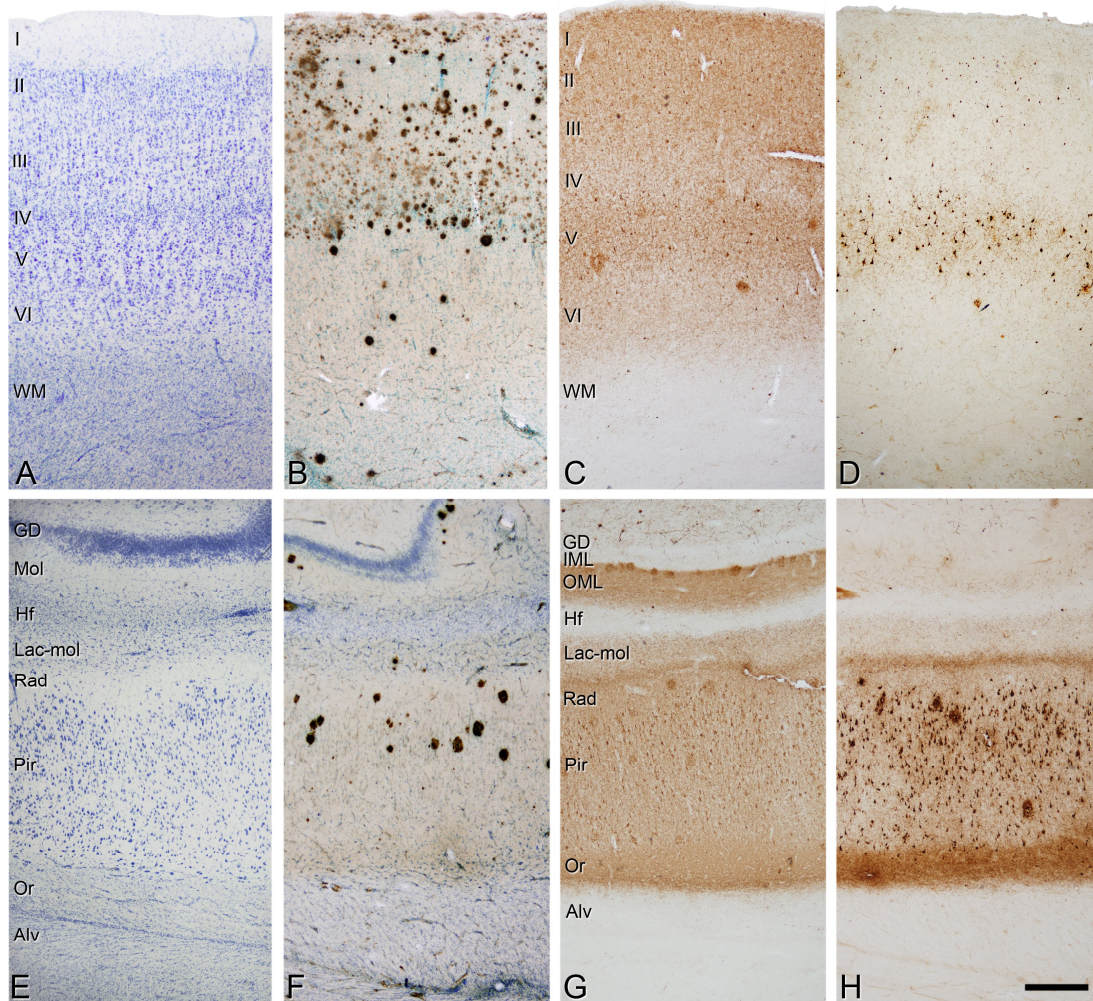
##### 3.2.3.1.1 Placas $\beta$ -amiloide

Para el análisis de la distribución y densidad de placas de A $\beta$  utilizamos 5- 6 secciones de 50  $\mu$ m de grosor por caso en tejido procedente del modelo APP/PS1 y de mate-

rial humano. Se procesaron para su tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-A $\beta$  humano producido en ratón (1:50, clone 6F/3D, Dako Glostrup, Dinamarca) según el siguiente protocolo:

Las secciones fueron primero tratadas en flotación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,66% durante 30 minutos para eliminar la actividad peroxidasa



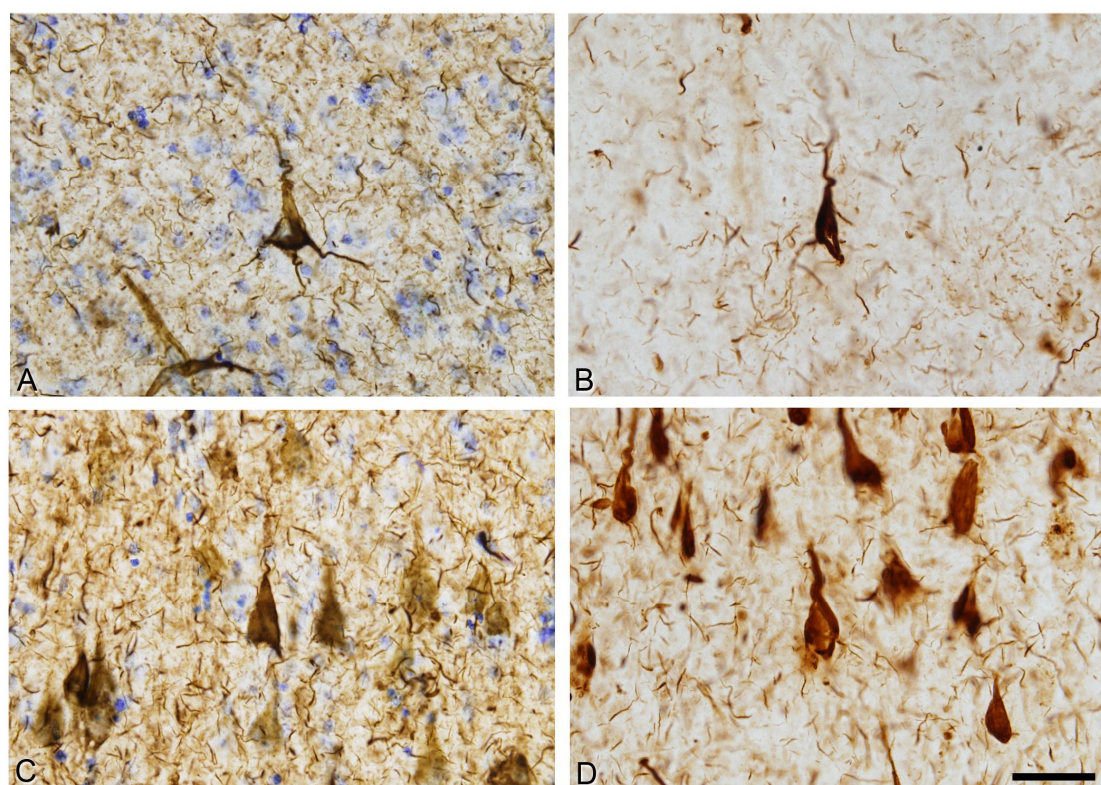


**Figura 20.** (A,E), (B,F), (C,G) y (D,H) Fotografías a mayor aumento de las Figuras 19A, 19B, 19C y 19D respectivamente mostrando las diferentes capas de la CPH (A-D) y las diferentes regiones citoarquitectónicas de CA1 (E-F) del paciente IF11, teñidas con (A,E) el método de Nissl, (B,F) A $\beta$ /Nissl, (C,G) PHF-tau<sub>AT8</sub> y (D,H) PHF-tau<sub>PHF1</sub>. WM, sustancia blanca; GD, giro dentado; Mol, stratum molecular; Hf, fisura hipocámpica; Lac-mol; stratum lacunosum-molecular; Rad; stratum radiatum; Pir, stratum piramidale; Or, stratum oriens; Alv, stratum alveus, IML, stratum molecular interno; OML, stratum molecular externo. Barra de escala, 250  $\mu$ m.

endógena. A continuación las secciones se incubaron con ácido fórmico (Sigma-Aldrich, ACS) al 55% en PB durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PB. Posteriormente, las secciones se sumergieron en una solución que contenía 0,25% Triton-X 100 y 3% de suero de caballo en PB (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, EEUU) durante 1 hora. Se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario y al día siguiente, 2 horas con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (1:200, BA-1000, Vector) generado en caba-

llo. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en PB tras lo cual las secciones se incubaron en el complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Elite PK6100, Vector) durante 1 hora. Finalmente, para la visualización del marcaje, las secciones fueron tratadas con el cromógeno DAB (3, 3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU; 0,05% en PB con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01%, durante 1 minuto). A continuación las secciones se incubaron en una solución de OsO<sub>4</sub> al 0,02% en PB durante 15 segundos a temperatura ambiente y





**Figura 21.** Fotografías de (A, C) la capa III de CPH y de (B, D) la capa piramidal de CA1, en las que se muestran (A, B) secciones teñidas para PHF-tau<sub>PHF-1</sub> y (C, D) PHF-tau<sub>AT8</sub>/Nissl. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

se montaron en portas gelatinizados que se dejaron secar durante 48 horas. Tras este proceso se realizó una contratinción con el método de Nissl (*vid.* § 3.2.1) (Figura 18, 19B, 20B, 20F). Finalmente, las secciones fueron deshidratadas mediante concentraciones crecientes de alcoholes (ETOH 50%, 70%, 96% y 100%, durante 10 minutos cada uno), clarificadas con xileno (durante 7 min) y montadas con el medio de montaje DPX.

### 3.2.3.1.2 Neuronas inmunoreactivas para PHF-tau

Secciones coronales de 50  $\mu$ m de grosor (5 - 6 secciones por caso) procedentes de material humano adyacentes a las utilizadas para detectar placas de A $\beta$ , fueron utilizadas para el marcaje inmunocitoquímico de las neuronas que expresan la proteína tau anormalmente hiperfosforilada que se encuentra formando filamentos helicoidales pareados

(PHF-tau). Con este fin, se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios contra PHF-tau-<sub>AT8</sub> (Figura 19C, 20C, 20G, 21A, 21C) (clon AT8, reconoce Ser202 y Thr205: Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU), y PHF-tau<sub>PHF-1</sub> (Figura 19D, 20D, 20H, 21B, 21D) (clon PHF1; reconoce Ser 396 y Ser404, cedido por Dr. P. Davies). Las secciones se trataron como en el procesamiento descrito en el apartado 3.2.3.1.1, excluyendo el tratamiento con ácido fórmico, con unas diluciones de 1:2000 y 1:100 para PHF-tau-<sub>AT8</sub> y PHF-tau<sub>PHF-1</sub>, respectivamente. Tras la tinción inmunocitoquímica se realizó una contratinción con el método de Nissl (*vid.* § 3.2.1)

### 3.2.3.1.3 Marcaje de neuronas

En cortes coronales de 50  $\mu$ m de grosor cortadas en vibratomo muestreadas sistemáticamente (5-6 secciones por caso) pro-



cedentes del modelo APP/PS1, se marcaron las neuronas con el anticuerpo anti-NeuN (1:2000, Chemicon; generado en ratón). Las secciones se trataron como en el procesamiento descrito en el apartado 3.2.3.1.1, excluyendo el tratamiento con ácido fórmico.

### 3.2.3.2 Marcaje doble

En el modelo APP/PS1, una vez finalizados los experimentos de inyección intracelular de las células piramidales en GD, CA1 y AL, las secciones fueron doblemente teñidas con tioflavina-s, que emite en color verde y azul, para visualizar las placas A $\beta$  en color verde (tioflavina-s al 1% en PB durante 15 minutos), posteriormente las secciones se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol: ETOH 100%, ETOH 70%, ETOH 50% y PB, durante 5 minutos cada uno. Finalmente, las secciones se montaron con el medio de montaje ProLong Gold Antifade Reagent.

### 3.2.3.3 Marcaje triple

En el material humano, una vez finalizados los experimentos de inyección intracelular de las células piramidales en CPH y CA1, las secciones fueron doblemente teñidas para visualizar LY y PHF-tau<sub>AT8</sub>, usando un anticuerpo contra LY (1:400000; generado en conejo, Instituto Cajal) y el anticuerpo contra PHF-tau<sub>AT8</sub>. Las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con dichos anticuerpos diluidos en una solución que contenía albúmina de suero bovino al 2%, 1% Tritón X-100 y 5% de sacarosa en PB. Al día siguiente las secciones fueron incubadas con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo producido en burro (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), diluido 1:100 en la misma solución, durante 4 horas. Posteriormente las secciones se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en PB con una mezcla de Alexa fluor-594 anti-IgG

de ratón (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) y Alexa fluor-488 conjugado con estreptavidina (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). Tras el análisis cuantitativo de las dendritas, las secciones se contratiñeron con tioflavina-s para visualizar las placas A $\beta$  en color azul (tioflavina-s al 1% en PB durante 15 minutos), posteriormente las secciones se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol: ETOH 100%, ETOH 70%, ETOH 50% y PB, durante 5 minutos cada uno. Finalmente, las secciones se montaron con el medio de montaje ProLong Gold Antifade Reagent.

## 3.2.4 Análisis cuantitativo

### 3.2.4.1 Procedimiento estereológico: Estimación del volumen ocupado por las placas

El análisis cuantitativo del volumen ocupado por las placas se realizó en cortes coronales de 50  $\mu$ m de grosor procedentes tanto del modelo APP/PS1 como de material humano procesados inmunocitoquímicamente para A $\beta$  y contrateñidos con el método de Nissl (*vid.* § 3.2.1) (Figura 18, Figura 20 B, C). La densidad de placas (número de placas/mm<sup>3</sup>) se calculó con el método del fraccionador óptico, mientras que para el cálculo del volumen ocupado por las mismas se realizó mediante la herramienta conocida como *Nucleator* (Moller *et al.*, 1990), utilizando el programa Stereo Investigator (MicroBrightfield, Inc., Williston, VT, EEUU). Este estudio se realizó con un microscopio óptico (Olympus BX51) equipado con una platina motorizada (Prior Scientific, Houston, TX, EEUU). Las placas se marcaron visualizadas en campos de 40x (AN, 0,85) en el caso del ratón APP/PS1 y de 20x (AN, 0,7) en el caso del tejido humano. El software eligió secuencialmente al azar marcos de contaje (en ratón APP/PS1: 100x100

$\mu\text{m}$  en GD y CA1,  $60 \times 60 \mu\text{m}$  en AL; en humano:  $100 \times 100 \mu\text{m}$  en CA1 y CPH) en los ejes xyz, moviendo la platina motorizada automáticamente.

Las placas fueron marcadas únicamente si se encontraban en el interior del disector, respetando los criterios de los límites de inclusión y exclusión y dentro de la altura del disector (en ratón APP/PS1:  $20\text{--}25 \mu\text{m}$ ; en material humano:  $10 \mu\text{m}$ ). El grosor de guarda se estableció en  $2 \mu\text{m}$ . El método de muestreo y el intervalo entre secciones fue testado en un experimento piloto con el fin de conocer el mínimo número de placas que son necesarias contar para estimar su densidad total y para mantener el coeficiente de error  $<0,09$ .

### 3.2.4.2 Procedimiento estereológico: Estimación del porcentaje de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir

Como en el caso anterior, la densidad por volumen de neuronas inmunoreactivas para PHF-tau-AT8 (PHF-tau-AT8-ir) y para PHF-tau-PHF1 (PHF-tau-PHF1-ir) (número de neuronas marcadas/ $\text{mm}^3$ ) y la densidad de neuronas totales (número de neuronas totales/ $\text{mm}^3$ ) se calculó en secciones  $50 \mu\text{m}$  de grosor procedentes de material humano. Los resultados se mostraron como porcentaje de neuronas marcadas con respecto al número de neuronas totales. Para estimar la densidad neuronal se emplearon secciones teñidas con el método de Nissl (*vid.* § 3.2.1, Figura 20 A, E). Para estimar la densidad de neuronas PHF-tau-AT8-ir o PHF-tau-PHF1-ir se marcaron las neuronas con los anticuerpos correspondientes (*vid.* § 3.2.3.1.2) y las secciones se contratiñeron con el método de Nissl (*vid.* § 3.2.1, Figura 20 C, D, G-H, 21). Se utilizó el programa Stereo Investigator y el mismo microscopio Olympus BX51 descrito anteriormente. Las neuronas se marcaron en

campos de  $40\times$  (AN, 0.85). El programa informático eligió secuencialmente al azar marcos de conteo para cuantificar la densidad neuronal total ( $60 \times 60 \mu\text{m}$ ,  $n=136$  en CPH,  $n=352$  en CA1), la densidad de neuronas PHF-tau-AT8-ir ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ ,  $n=1454$  en CPH,  $n=800$  en CA1) y la densidad de neuronas PHF-tau-PHF1-ir ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ ,  $n=647$  en CPH,  $n=1198$  en CA1), moviendo la platina motorizada automáticamente. Para obtener estimaciones homogéneas de la densidad neuronal, el encogimiento del tejido fue evaluado usando el programa Stereo Investigator, midiendo el contorno y el grosor del tejido en cinco puntos distintos al azar en tres cortes diferentes y tomando como valor real el promedio de todas las medidas. Las neuronas fueron marcadas únicamente si se encontraban en el interior del disector, respetando los criterios de los límites de inclusión y exclusión y dentro de la altura del disector ( $10 \mu\text{m}$ ). El grosor de guarda se estableció en  $3 \mu\text{m}$ . El método de muestreo y el intervalo entre secciones fue testado en un experimento piloto con el fin de estimar el mínimo número de neuronas que son necesarias contar para estimar su densidad total y para mantener el coeficiente de error  $<0,09$ .

### 3.2.4.3 Procedimiento estereológico: Estimación de la densidad de neuronas NeuN-ir

El análisis cuantitativo la densidad de neuronas totales (número de neuronas NeuN-ir/ $\text{mm}^3$ ) se realizó en cortes coronales de  $50 \mu\text{m}$  de grosor procedentes de ratones APP/PS1 y Tg- procesados inmunocitoquímicamente para NeuN (*vid.* § 3.2.1). Se utilizó el programa Stereo Investigator y el mismo microscopio Olympus BX51 descrito anteriormente. Las neuronas se marcaron en campos de  $100\times$  (AN, 1,35). El programa

informático eligió secuencialmente al azar marcos de contaje ( $25 \times 25 \mu\text{m}$ ), para cuantificar la densidad neuronal total moviendo la platina motorizada automáticamente en los ejes xyz, para los campos delimitados previamente.

Las neuronas fueron marcadas únicamente si se encontraban en el interior del disector, respetando los criterios de los límites de inclusión y exclusión y dentro de la altura del disector ( $20 \mu\text{m}$ ). El grosor de guarda se estableció en  $3 \mu\text{m}$ . El método de muestreo y el intervalo entre secciones fue testado en un experimento piloto con el fin de conocer el mínimo número de placas que son necesarias contar para estimar su densidad total y para mantener el coeficiente de error  $<0,09$ .

### 3.2.5 Estudio morfométrico de las neuronas inyectadas: Reconstrucción y análisis

#### 3.2.5.1 Modelo APP/PS1

Las dendritas fueron escaneadas con un microscopio láser confocal multiespectral Leica (TCS SP5), usando las líneas de láser 488 y 594 nm. La reconstrucción de las neuronas marcadas se realizó mediante pilas de imágenes (tamaño  $76,9 \times 76,9 \mu\text{m}$ , tamaño de píxel  $0,075 \times 0,075 \mu\text{m}$  y resolución  $1024 \times 1024$ ) compuestas por 10-150 planos de imágenes. Se utilizó una lente de inmersión en glicerol de 63x (AN, 1,3; índice de refracción 1,45) con zoom 3,2 y un paso de z de  $0,14 \mu\text{m}$ . Estos parámetros representan la mayor resolución posible que se puede obtener con este microscopio confocal. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas con un algoritmo de deconvolución tridimensional mediante 10 iteraciones (Autodeblur, Autoquant, MD, EEUU) para reducir el efecto de "fuera de foco" de las imágenes tridimensionales microscópicas (Figura 22).

Densidad de espinas: para el análisis de densidad de espinas dendríticas las imágenes tomadas anteriormente fueron visualizadas con el módulo confocal de Neurolucida 8.03 (MicroBrightfield, Inc., Williston, VT, EEUU). Las dendritas se trazaron a lo largo de toda su longitud y las espinas fueron marcadas individualmente en tres dimensiones.

Diámetro dendrítico: a la vez que se trazaba la longitud de la dendrita para calcular la densidad de espinas, se utilizó una herramienta que permite cambiar el grosor del trazo, haciéndolo coincidir perfectamente con el grosor de la misma, para calcular después su diámetro.

Morfología de las espinas: para el análisis morfológico (volumen de la cabeza y longitud del cuello dendrítico) de las espinas dendríticas se utilizaron las mismas imágenes que para el análisis de la densidad de espinas. Para ello, se utilizó el software Imaris 6.0 (Bitplane AG, Zurich, Suiza), creando superficies sólidas que marcaban perfectamente el contorno de las cabezas (Figura 23) y marcando manualmente en tres dimensiones la longitud del cuello (Figura 24).

Reconstrucción del árbol dendrítico: utilizando el microscopio confocal TCS SP5, se tomaron imágenes usando las líneas de láser 488 y 594 nm, y con un paso de z de  $1 \mu\text{m}$ . Los conjuntos de imágenes (tamaño  $76,9 \times 76,9 \mu\text{m}$ , tamaño de píxel  $0,075 \times 0,075 \mu\text{m}$  y resolución  $1024 \times 1024$ ) fueron importados al módulo confocal de Neurolucida 8.03, y los árboles dendríticos neuronales fueron trazados tridimensionalmente marcando las dendritas y los puntos de bifurcación a lo largo de toda la profundidad del conjunto de imágenes. Se realizó un análisis de Sholl para cada neurona, calculando automáticamente el número de intersecciones dendríticas y la longitud dendrítica en intervalos de

10  $\mu\text{m}$  comenzando por el soma. El conjunto formado por la longitud dendrítica total, el número de intersecciones y las ramas totales para cada neurona, fue considerado como el grado de complejidad dendrítica. Debido a que las rodajas de 150  $\mu\text{m}$  de grosor no contienen el árbol dendrítico completo, los valores obtenidos se refieren a la longitud dendrítica total y longitud y número de intersecciones representadas en el árbol dendrítico incluido en la rodaja.

Para el correcto análisis de todas las medidas morfológicas, antes del análisis las imágenes fueron abiertas con Imaris 5.0 y el canal verde que contiene las placas A $\beta$  fue eliminado. Posteriormente se codificaron y fueron analizadas por otro investigador usando solo el canal rojo, con el fin de realizar todo el experimento a ciegas para prevenir el sesgo.

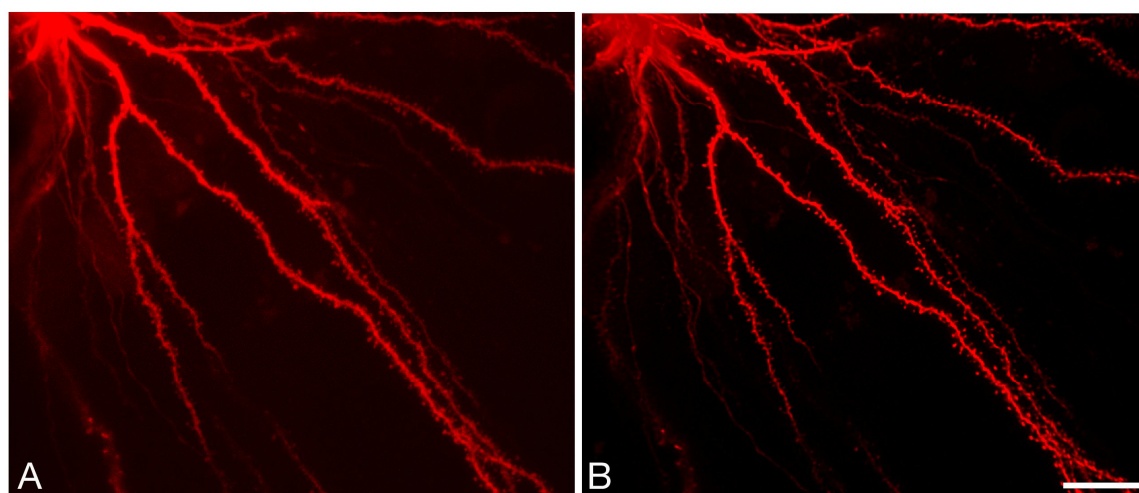
### 3.3.3.2 Tejido humano

Las dendritas fueron escaneadas con un microscopio confocal láser multiespectral Zeiss (LSM 710) equipado con un laser mixto de argón y criptón, usando las líneas de laser 488 y 594 nm. La reconstrucción de las neuronas marcadas se realizó mediante pi-

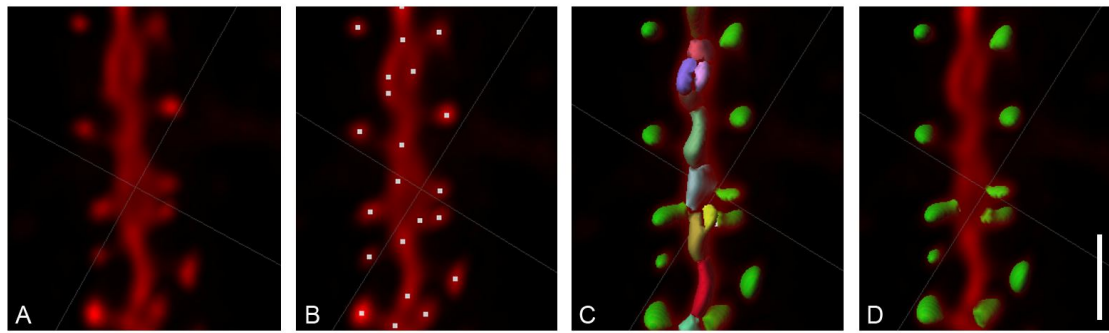
las de imágenes (tamaño de pixel, 0,057 x 0,057  $\mu\text{m}$  y tamaño de la imagen 58,36 x 58,36  $\mu\text{m}$ ) compuestos de 10-100 planos de imágenes. Se utilizó una lente de inmersión en aceite de 63x (AN, 1,40; índice de refracción 1,518) con zoom 2,3 y un paso de z de 0,28  $\mu\text{m}$ . Para optimizar la imparcialidad de las medidas morfológicas se realizó un análisis a ciegas de la siguiente manera: las imágenes fueron abiertas con Imaris 7.1 y el canal rojo que contiene el marcaje PHF-tau<sub>AT8</sub> fue eliminado. Posteriormente se codificaron las imágenes y fueron analizadas por otro investigador usando solo el canal verde.

Diámetro dendrítico: utilizando el software Imaris 7.1, se trazaron tridimensionalmente las dendritas a lo largo de toda su longitud, estableciendo segmentos de longitudes de 10  $\mu\text{m}$  desde el soma hasta el final de la dendrita. A continuación se midió el grosor de la dendrita cada 10  $\mu\text{m}$  para establecer el diámetro dendrítico medio.

Densidad y morfología de las espinas: se calculó la densidad de espinas como el número de espinas dendríticas a lo largo de la distancia al soma en segmentos de 10  $\mu\text{m}$ ,



**Figura 22.** (A) Imagen tomada con microscopio confocal de una neurona inyectada con Alexa594 procedente de un ratón Tg-. (B) La misma imagen tras aplicar el algoritmo de deconvolución tridimensional mediante 10 iteraciones para reducir el efecto “fuera de foco”. Barra de escala, 20 $\mu\text{m}$ .



**Figura 23. Inyecciones intracelulares y metodología para estimar el volumen de las cabezas de las espinas dendríticas.** (A) Segmento de una dendrita procedente de una neurona inyectada con Alexa 594 de un ratón Tg. (B) La misma imagen en la que se han marcado los puntos a partir de los cuales se establecen superficies sólidas para la posterior estimación del volumen de las cabezas de las espinas. (C) Ejemplo de una superficie sólida que coincide perfectamente con los volúmenes de las cabezas. (D) Imagen final con las medidas de los volúmenes de las cabezas seleccionadas. Barra de escala, 2  $\mu\text{m}$ .

desde el soma hasta el final de la dendrita. Para el cálculo del volumen de cada espina, se crearon varias superficies que delimitaban perfectamente el contorno en tres dimensiones de toda la dendrita (Figura 25). Estas superficies consisten en objetos sólidos artificiales generados por ordenador creados a partir de un rango específico de valores de grises de las imágenes. Además se estableció la condición de que cada superficie se generara a partir de puntos situados a lo largo de toda la dendrita incluyendo las cabezas de todas las espinas. De todas las superficies creadas, se eligió aquella que mejor se ajustara al tamaño (volumen) de la espina. La longitud de la espina se marcó manualmente en tres dimensiones, desde el punto de inserción de la espina en la dendrita hasta el final de la espina.

### 3.2.6 Análisis estadístico

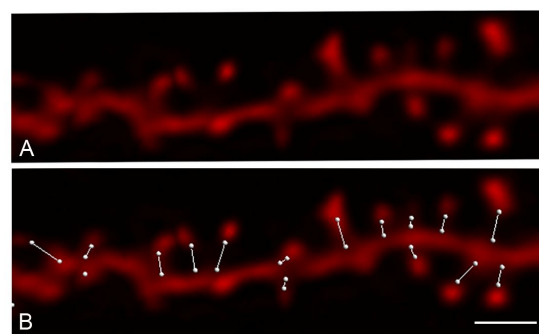
#### 3.2.6.1 Ratón APP/PS1

Para todos los parámetros morfológicos dendríticos medidos se promediaron los valores para calcular la media por neurona y, en segundo lugar, los valores morfológicos neuronales de cada animal, para obtener una media por animal. Tras comprobar que los valores tenían una distribución

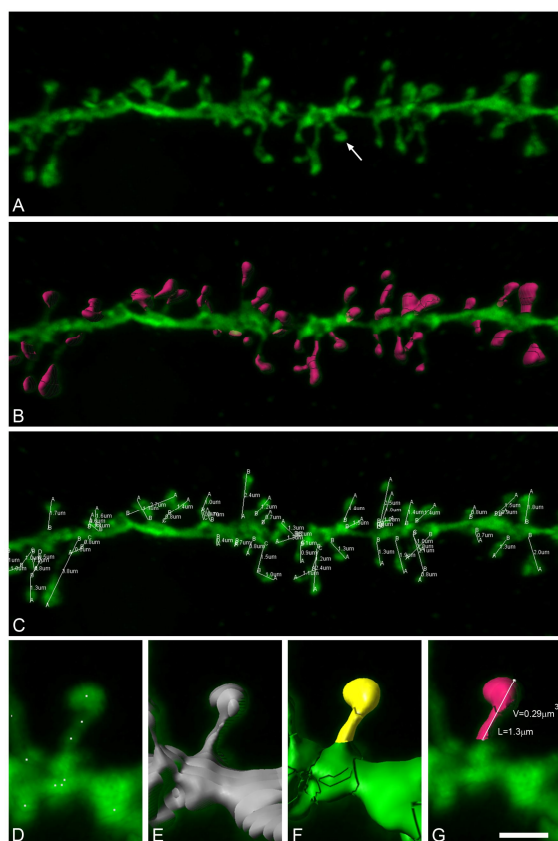
Gaussiana mediante el test Kolmogorov-Smirnov se aplicó la prueba *t-student*. Para comparar más de dos grupos, utilizamos un ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple *Newman-Keuls*. Todos los datos fueron presentados como media  $\pm$  error estándar. Para comparar un parámetro morfológico entre dos o más grupos en función de la distancia al soma utilizamos un ANOVA de dos vías seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple Bonferroni.

#### 3.2.6.2 Tejido humano

Para todos los parámetros morfológicos



**Figura 24. Inyecciones intracelulares y metodología para estimar la longitud del cuello de la espina.** (A) Segmento de una dendrita procedente de una neurona inyectada con Alexa594 de un ratón Tg-. (B) La misma imagen en la que se han marcado en tres dimensiones las longitudes de los cuellos de las espinas dendríticas. Barra de escala, 1,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25. Inyecciones intracelulares y metodología.**

(A) Segmento de una dendrita procedente de una neurona inyectada con Lucifer Yellow de la capa III de la CPH. (B, C) misma imagen que en A, en la que se muestra el proceso seguido para la estimación tridimensional de los volúmenes (B) y de las longitudes (C) de las espinas dendríticas. (D-G) Imagen a mayor aumento de la espina señalada en A con una flecha, para mostrar cómo se realiza el cálculo de su volumen mediante la creación de una superficie sólida a partir de puntos de crecimiento (indicados como puntos blancos) (D). De las superficies creadas se eligió aquella que delimitaba perfectamente el contorno en tres dimensiones de la espina completa (E). La espina en estudio (F) se separó de toda la superficie creada, y finalmente se obtuvo el volumen de la espina (rosa), y se determinó su longitud (G). Barra de escala, (A-C) 2  $\mu\text{m}$ , (D-G) 1  $\mu\text{m}$ .

medidos, se promediaron los valores para calcular una media por dendrita, y todos los datos fueron presentados como media  $\pm$  error estándar. Se aplicó la prueba *U* de Mann-whitney para comparar valores totales y el análisis Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras para la comparación entre las frecuencias acumuladas. Se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple Bonferroni para comparar entre los grupos en función de la distancia al soma.

## **IV. RESULTADOS**





## IV. RESULTADOS

### 4.1. Patología amiloide

#### 4.1.1 Amígdala lateral

##### 4.1.1.1 Estudios de comportamiento

##### 4.1.1.1.1 Laberinto en cruz elevado

Con el fin de determinar si existían diferencias en el nivel de ansiedad entre los grupos APP/PS1 ( $n=6$ ) y Tg- ( $n=7$ ) se realizó el test de laberinto en cruz elevado (*vid.* § 3.1.1.2). La ansiedad es un factor que puede influir en los resultados obtenidos en el test de miedo condicionado mediante estímulos auditivos (Lister, 1987). No aparecieron diferencias entre los grupos estudiados (Figura 26A, B), indicando que los posibles cambios en el comportamiento durante la realización del test de miedo condicionado no pueden ser explicados por distintos niveles de ansiedad.

##### 4.1.1.1.2 Miedo condicionado mediante estímulos auditivos

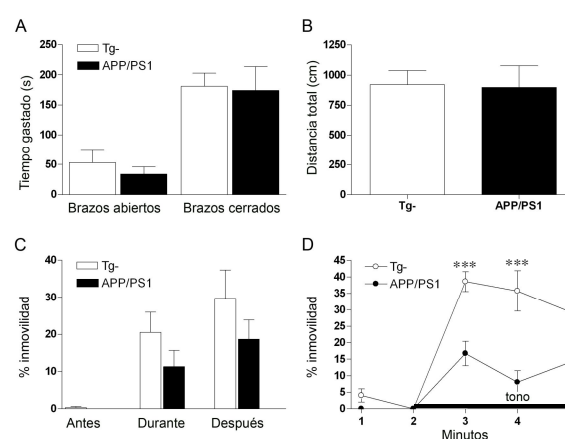
Para evaluar el posible daño en la amígdala lateral (AL) en este modelo, realizamos el test de miedo condicionado (memoria no declarativa) mediante estímulos auditivos (*vid.* § 3.1.1.3) que es un modelo de aprendizaje emocional en animales, que evalúa la memoria del miedo condicionado y cuya respuesta depende de la AL (Phillips *et al.*, 1992 y Kim *et al.*, 1993). Durante el test, se comparó el porcentaje de *freezing* (inmovilidad) mostrado por cada grupo (ratones controles Tg- y ratones APP/PS1). Durante el entrenamiento del condicionamiento, se midió el porcentaje de inmovilidad presentado por ambos grupos antes durante y después del shock, (Figura 26C). Antes de la presentación del shock ambos grupos presentaron un porcentaje muy bajo de inmovilidad. Cuando se analizó la inmovilidad durante y después de la presentación del shock quedó demostrado que los animales habían adquirido la inmovilidad

como respuesta ante el shock (Figura 26D). Los análisis estadísticos de la inmovilidad presentada por ambos grupos durante y después del shock no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos ( $P=0,218$  y  $P=0,277$ , durante y después respectivamente).

Como se muestra en la Figura 26D, en el día del test ambos grupos presentaron muy poca inmovilidad antes del tono. Sin embargo, inmediatamente después de presentar el tono (minuto 3) aparecieron diferencias significativas entre ambos grupos ( $P=0,0007$ , *t-test*). Los ratones APP/PS1 presentaron un 42% menos de inmovilidad que los animales Tg-, indicando que la memoria condicionada al miedo mediante estímulos auditivos está dañada en los ratones APP/PS1.

##### 4.1.1.1.3 Umbral de dolor

Se determinó el umbral de dolor (*vid.* § 3.1.1.4) para los ratones Tg- y los ratones APP/PS1 ( $P=0,66$  y  $0,100 \pm 0,025$  mA para los ratones Tg- y  $0,086 \pm 0,014$  mA para los



**Figura 26. Comportamiento normal relacionado con la ansiedad y alteraciones en la realización del test de miedo condicionado mediante estímulos auditivos.** (A, B) La exploración en el laberinto en cruz elevado fue considerada como una medida de ansiedad. (A) la distancia total recorrida en el laberinto y (B) el tiempo gastado en los brazos abiertos y cerrados fue similar en los ratones Tg- y los ratones APP/PS1. (C) Porcentaje de inmovilidad antes, durante y después del shock. (D) Inmovilidad presentada en el día del test antes y durante la presentación del tono. Nótese que el porcentaje de inmovilidad fue menor en el ratón APP/PS1. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

ratones APP/PS1). Lo que indicó que, los ratones APP/PS1 no presentaban alteraciones en su sensibilidad al dolor.

#### 4.1.1.2 Volumen ocupado por las placas

Se encontró que la fracción de volumen ocupada por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total de la AL (*vid.* § 3.2.4.1) era relativamente pequeña, representando tan solo un  $0,6 \pm 0,11\%$  del volumen total. La densidad de placas en la AL fue  $4,13 \pm 0,45$  placas/100  $\mu\text{m}^3$  ( $n=4$ ) y la media del volumen ocupado por las placas fue  $1496 \pm 317,7$   $\mu\text{m}^3$ .

#### 4.1.1.3 Densidad neuronal en AL

Para el estudio de la posible pérdida neuronal en la AL teñimos las secciones con el anticuerpo NeuN (*vid.* § 3.2.3.1.3). Utilizando métodos estereológicos (*vid.* § 3.2.4.3), no se encontraron diferencias en la densidad de neuronas entre ratones controles Tg- ( $7,85 \pm 0,70$  neuronas/100  $\mu\text{m}^3$ ;  $n=4$ ) y ratones APP/PS1 ( $7,81 \pm 0,42$  neuronas/100  $\mu\text{m}^3$ ;  $n=4$ ,  $P=0,22$ , *t-test*).

#### 4.1.1.4 Alteraciones en la complejidad del árbol dendrítico

Examinamos las imágenes tomadas mediante microscopia confocal según las condiciones indicadas en el apartado 3.2.5.1 de 143 y 135 neuronas de proyección inyectadas en secciones de cerebro de ratones APP/PS1 y ratones controles Tg- respectivamente. Para el estudio de las posibles alteraciones morfológicas en el árbol dendrítico de las neuronas de proyección de la AL se establecieron tres categorías de neuronas según su relación con las placas (Figura 27A-C):

1. Neuronas controles (NTg-).
2. Neuronas libres de placas (NLP, fuera del alcance de las placas).
3. Neuronas que tienen al menos una dendrita en contacto con la placa (NTP).

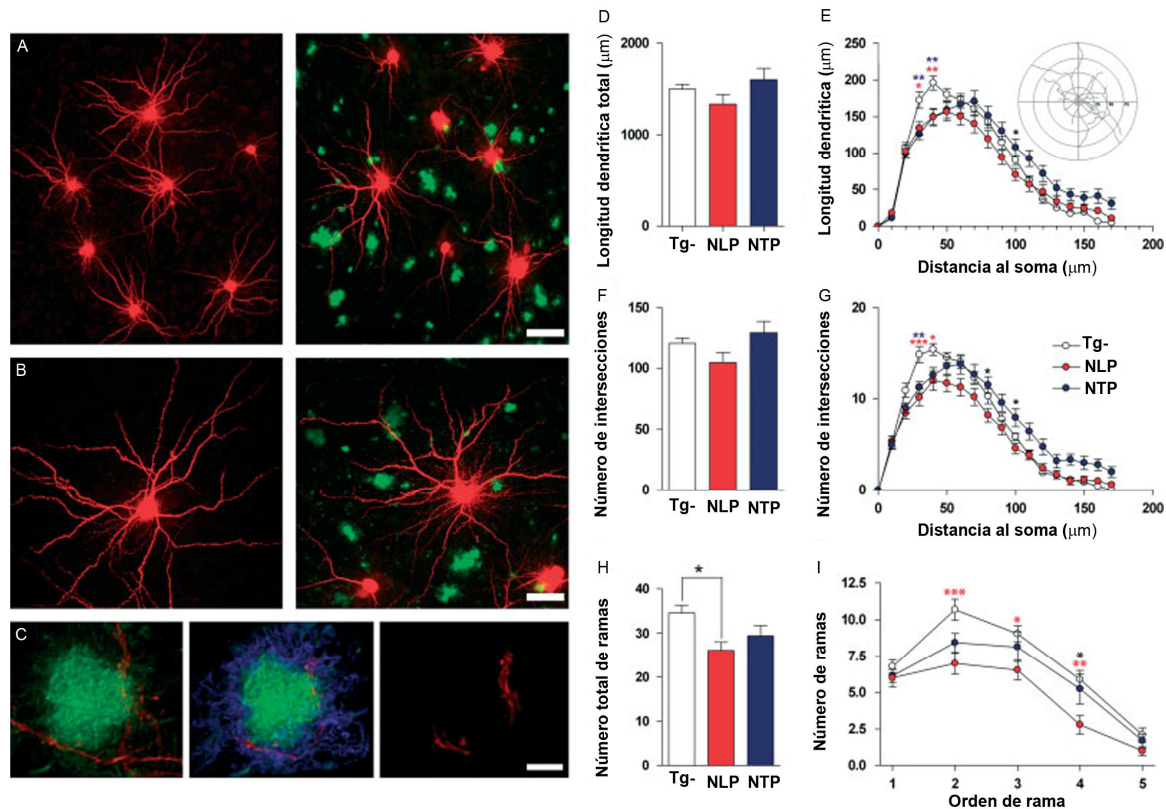
Se estudiaron distintos parámetros morfométricos (*vid.* § 3.2.5.1) y entre los distintos grupos, se encontraron una serie de variaciones que se describen a continuación:

La longitud dendrítica total y el número total de intersecciones no fueron significativamente diferentes entre los tres grupos (Figura 27D, F). Sin embargo, el análisis de la longitud de las dendritas en función de su distancia al soma sí mostró diferencias significativas ( $P<0,0001$ , ANOVA de dos vías, Figura 27E), dando como resultado que las neuronas pertenecientes a los ratones APP/PS1 (NLP y NTP) tenían menor longitud dendrítica a una distancia de 30-40  $\mu\text{m}$  del soma que las neuronas controles Tg- ( $P<0,05$ , test Bonferroni *post-hoc*). También mostraron un menor número de intersecciones a 30-40  $\mu\text{m}$  del soma en las neuronas pertenecientes a los ratones APP/PS1 ( $P<0,05$ , test Bonferroni *post-hoc*, Figura 27G).

Se hallaron diferencias en el número total de ramas por neurona entre los tres tipos de neuronas ( $P=0,016$ , ANOVA de una vía, test de comparación múltiple *Newman-Kleus*, Figura 27H). El análisis mediante ANOVA de dos vías del número de ramas dendríticas de cada orden reveló una disminución en el número de ramas dendríticas de orden 2º, 3º y 4º por neurona en NLP ( $P<0,001$ ,  $P<0,05$  y  $P<0,01$  respectivamente, Figura 27I). También aparecieron diferencias entre las neuronas NTP y NLP en las ramas dendríticas de 4º orden ( $P<0,05$ ). Es decir, la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas NLP es significativamente menor que en las neuronas NTg-.

#### 4.1.1.5 Diámetro y densidad dendrítica

Para comparar el diámetro y la longitud dendrítica se establecieron cuatro categorías de dendritas, dependiendo de su relación



**Figura 27. Inyecciones intracelulares en AL y análisis morfométrico.** (A) Panorámica de imágenes tomadas con microscopio confocal de AL, mostrando neuronas inyectadas con Alexa594 y placas marcadas con tioflavina-s en un ratón control Tg- (izquierda) y un ratón APP/PS1 (derecha). (B) Imágenes de neuronas de ratones Tg- (izquierda) y ratones APP/PS1 (derecha). (C) Método utilizado para distinguir dendritas y espinas que pasan por placa: (izquierda) dendrita tocando una placa, (centro) la imagen anterior con el borde de la placa señalado en azul, (derecha) la placa es eliminada y solo nos queda el trozo de la dendrita que pasa por el borde de la placa. Este proceso fue llevado a cabo después de realizar las medidas sobre las imágenes sin conocer el tipo de tejido analizado. (D) Longitud dendrítica total de las distintas categorías de neuronas. (E) Análisis de Sholl mostrando la longitud dendrítica como función de la distancia al soma. Los asteriscos rojos representan diferencias significativas entre Tg- y NLP; los asteriscos azules representan diferencias significativas entre Tg- y NTP, los asteriscos negros representan diferencias significativas entre NTP y NLP. El diagrama representa el Sholl análisis basado en círculos concéntricos alrededor del soma. (F) Número total de intersecciones de las diferentes categorías neuronales. (G) Número total de intersecciones en función de la distancia al soma. El color de los asteriscos representa lo mismo que en el apartado E. (H) Número total de ramas de las diferentes categorías neuronales. (I) Número total de ramas en función de la distancia al soma. El color de los asteriscos representa lo mismo que en el apartado E. Barra de escala (A) 50  $\mu\text{m}$ , (B) 25  $\mu\text{m}$ , (C) 5  $\mu\text{m}$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

con las placas (Figura 28A):

1. Dendritas controles (dendritas Tg-).
2. Dendritas que no están en contacto con las placas (dendritas LP).
3. Segmentos de dendritas que están en contacto con una placa, sin el segmento que contacta con la placa (dendritas TP).
4. Segmentos de dendritas que pasan por dentro de una placa (dendritas PP).

Encontramos diferencias en el diámetro de las dendritas entre las cuatro categorías

de dendritas ( $P=0,0001$ , ANOVA de una vía, test de comparación múltiple *Newman-Kleus*, Figura 28B). El diámetro de las dendritas PP ( $0,36 \pm 0,009\mu\text{m}$ ;  $n=20$  dendritas) fue significativamente menor ( $P<0,001$ ) que en el resto de las dendritas: dendritas TP ( $0,72 \pm 0,06\mu\text{m}$ ;  $n=45$  dendritas), dendritas LP ( $0,76 \pm 0,05\mu\text{m}$ ;  $n=58$  dendritas) y dendritas Tg- ( $0,79 \pm 0,06\mu\text{m}$ ;  $n=66$  dendritas). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre dendritas Tg-, LP o TP.

Es decir, que el contacto de la dendrita con la placa induce una disminución del diámetro dendrítico de aproximadamente 54% solo en el segmento de las dendritas en contacto con la placa, pero no en el resto de la dendrita.

En cuanto a la densidad de espinas en los distintos tipos de dendritas, encontramos diferencias ( $P=0,002$ , ANOVA de una vía, Figura 28C) entre las dendritas PP que presentaban una menor densidad ( $0,50 \pm 0,09$  espinas/ $\mu\text{m}$ ;  $P<0,05$ , test de comparación múltiple *Newman-Kleus*) que las dendritas Tg- ( $0,96 \pm 0,07$  espinas/ $\mu\text{m}$ ), las dendritas TP ( $0,76 \pm 0,08$  espinas/ $\mu\text{m}$ ) y las dendritas LP ( $0,83 \pm 0,04$  espinas/ $\mu\text{m}$ ). La densidad de espinas en función de la distancia al soma (mediante análisis de Sholl con ANOVA de dos vías), reveló que no existían diferencias entre los distintos grupos (Figura 28D). Se comparó la densidad de espinas dendríticas de los segmentos que se encontraban dentro de la placa (dendritas PP) con la media de los segmentos de las dendritas Tg- a la misma distancia del soma. Encontramos una disminución en la densidad de espinas del 33% ( $P=0,0059$ , *t-test*, Figura 28E). Sin embargo, cuando comparamos la densidad de espinas como función de la distancia a la placa, observamos que no había diferencias con respecto a las dendritas Tg- (Figura 28F), comprobando así, que la disminución de espinas se encontraba restringida únicamente a los segmentos que se localizaban atravesando las placas.

#### 4.1.1.6 Alteraciones morfológicas de las espinas

Para el análisis de los distintos parámetros morfológicos (*vid.* § 3.2.5.1), se establecieron las mismas cuatro categorías que para el análisis de las dendritas dependiendo de su relación con las placas (Figura 29A):

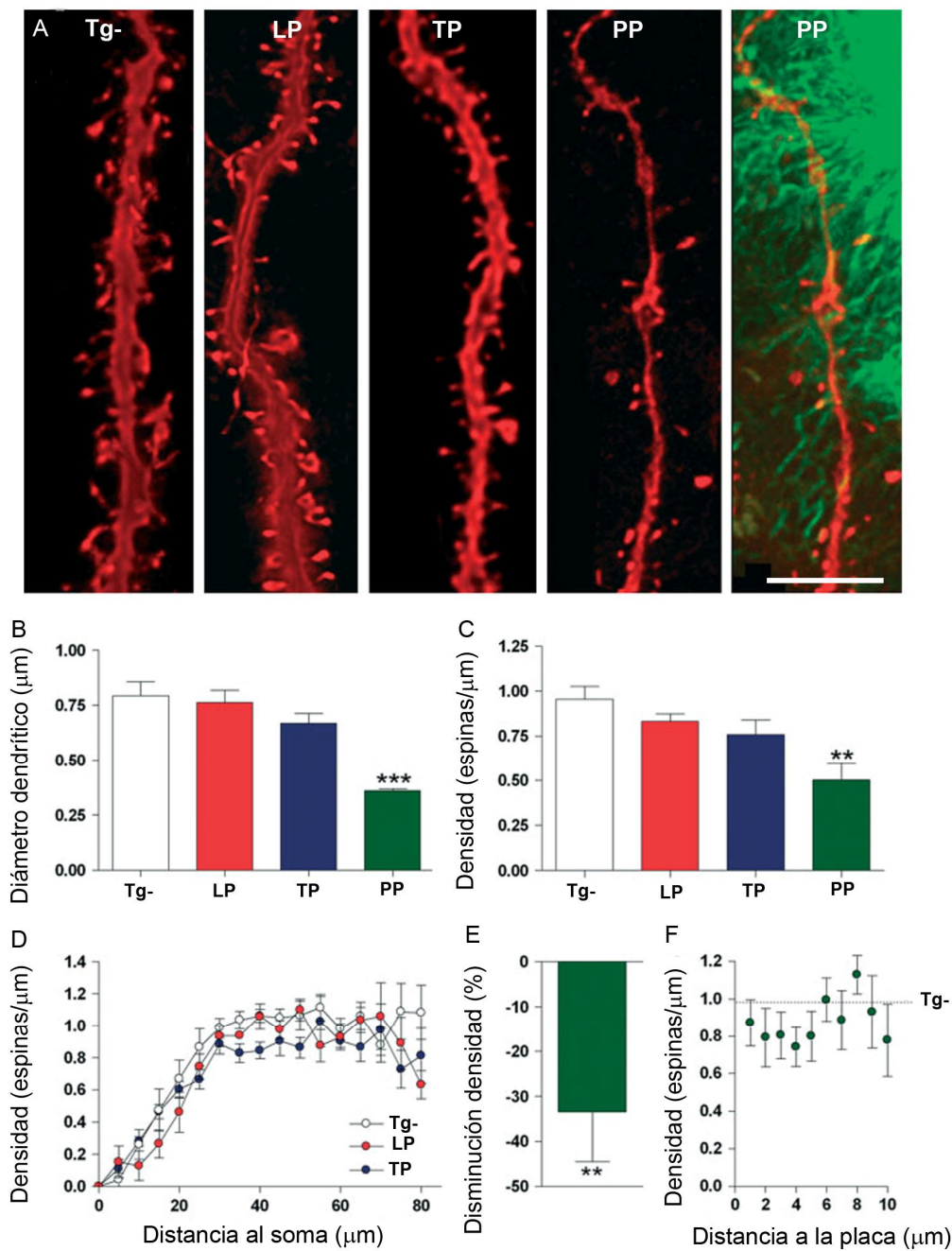
1. Espinas pertenecientes a dendritas controles (espinas Tg-).
2. Espinas pertenecientes a dendritas que no están en contacto con las placas (espinas LP).
3. Espinas pertenecientes a segmentos de dendritas que están en contacto con una placa sin el segmento que contacta con la placa (espinas TP).
4. Espinas pertenecientes a segmentos de dendritas que pasan por dentro de una placa (espinas PP).

El análisis del volumen de las cabezas ( $P=0,42$ , ANOVA de una vía, Figura 29D) y de la longitud del cuello dendrítico ( $P=0,48$ , ANOVA de una vía, Figura 29C) no mostró diferencias entre los distintos grupos de espinas: Tg- ( $0,05 \pm 0,005 \mu\text{m}^3$ ;  $0,7 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ; Volumen y longitud respectivamente,  $n=3949$  espinas), LP ( $0,05 \pm 0,005 \mu\text{m}^3$ ;  $0,66 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ;  $n=3268$  espinas), TP ( $0,06 \pm 0,005 \mu\text{m}^3$ ;  $0,59 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ;  $n=3577$  espinas) y PP ( $0,06 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$ ;  $0,5 \pm 0,18 \mu\text{m}$ ;  $n=63$  espinas). Encontramos cambios significativos en las espinas LP cuando comparamos las frecuencias de las espinas según el volumen de la cabeza ( $P=0,012-0,048$ , test *Kolmogorov-Smirnov*, Figura 29E), mostrando una disminución del 74% en la frecuencia de espinas de cabeza grande (volumen  $>0,18 \mu\text{m}^3$ ) cuando se comparan con espinas Tg-. Es decir, las dendritas LP tienen menor frecuencia de espinas de cabeza grande.

#### 4.1.2 Giro dentado

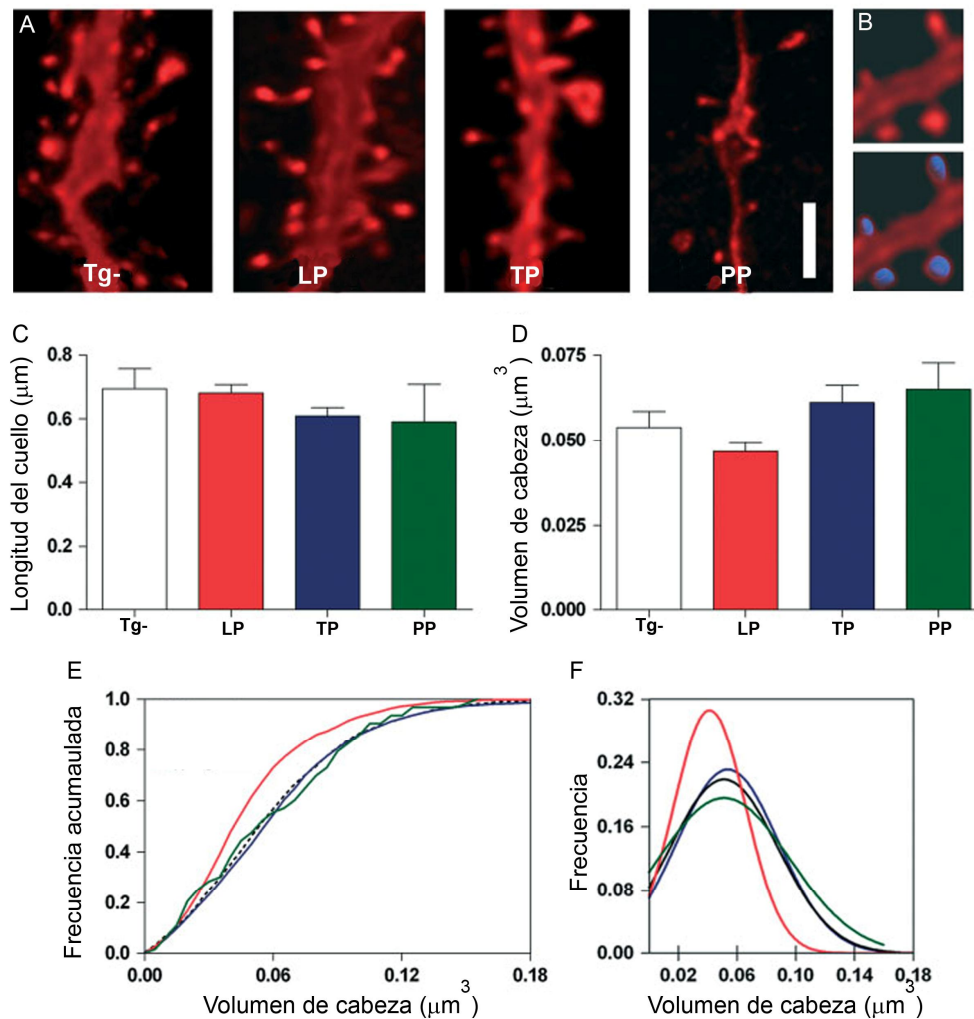
##### 4.1.2.1 Volumen ocupado por las placas

Se cuantificó la fracción de volumen ocupada por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total de la capa molecular del giro dentado (*vid.* § 3.2.4.1). Se observó que era relativamente pequeña ya que solo ocupaban un volumen de aproximadamente 4%. La capa molecular se dividió en la capa mole-



**Figura 28. La disminución del diámetro dendrítico y de la densidad de espinas se encuentra restringido a las placas.** (A) Imágenes de dendritas de ratones Tg- y ratones APP/PS1. Tg-, dendrita de ratón control; LP, dendritas que no están en contacto con las placas; dendritas TP, dendritas que están en contacto con una placa, sin el segmento que contacta con la placa; dendritas PP, segmentos de las dendritas que pasan por dentro de una placa. (B) El diámetro dendrítico fue significativamente menor dentro de las placas y (C) la densidad de espinas también fue significativamente menor dentro de las placas. (D) La densidad de espinas en función de la distancia al soma (análisis de Sholl) es similar en los ratones Tg- y en los ratones APP/PS1 en las regiones libres de placas (LP y TP). (E) Para cada segmento relacionado con la placa, se midió la distancia a la placa desde el soma y se comparó la densidad de espinas para cada segmento con la densidad de espinas en segmentos Tg- medidos a la misma distancia. (F) Densidad de espinas en función de la distancia a la placa. Nótese que fuera de las placas, la densidad de espinas se conserva. Barra de escala, 5  $\mu\text{m}$ . \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .





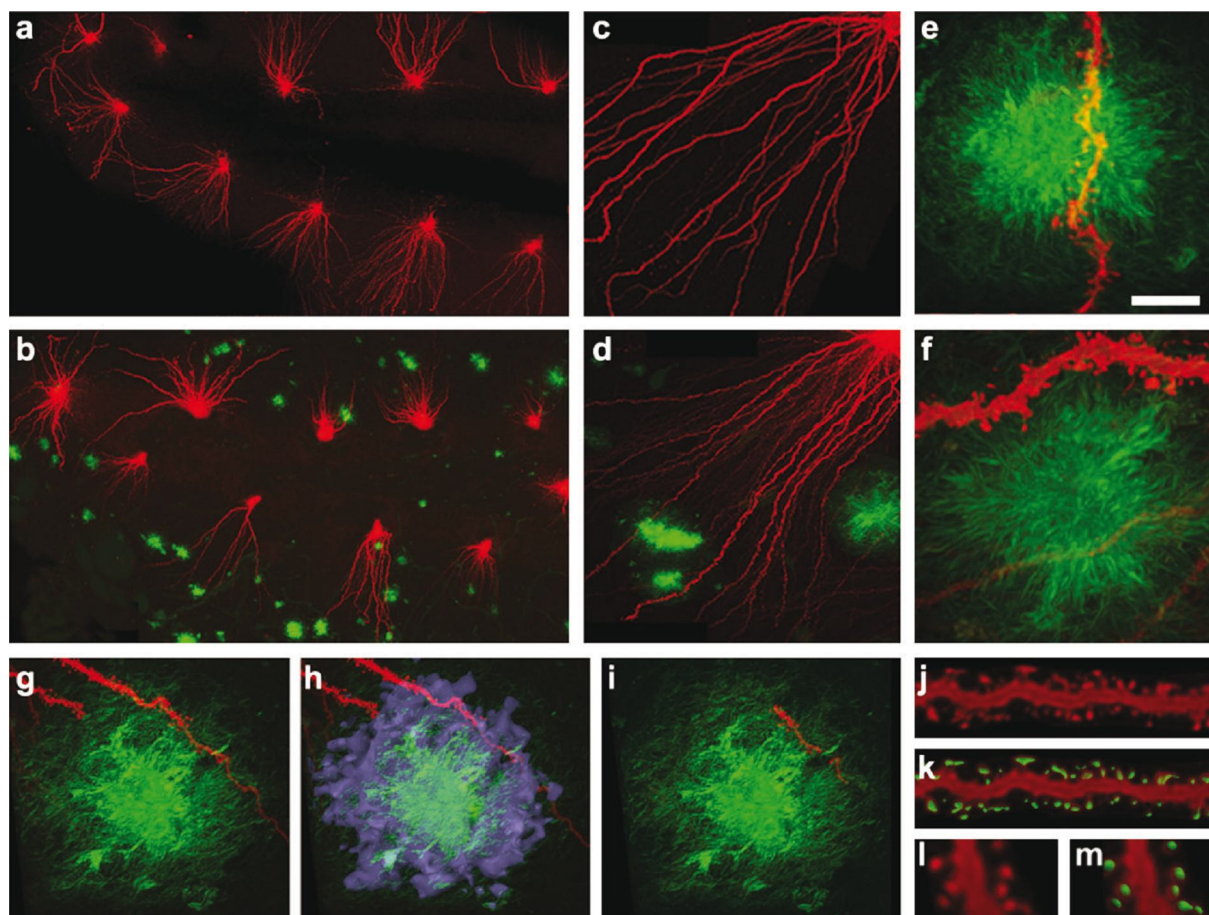
**Figura 29. Aparecen cambios en el volumen de las cabezas de las espinas en las neuronas libres de placas.** (A) Imágenes de dendritas tomadas con microscopio confocal para cada categoría de espina incluida en el análisis. (B) Ejemplo de la medida obtenida del volumen de la cabeza de la espina (azul). (C, D) Gráfico de barras comparando la longitud de los cuellos y de los volúmenes de las cabezas de las espinas. (E) Curva de frecuencia acumulada mostrando la distribución de los volúmenes de las cabezas. (F) Histograma de la distribución de los volúmenes de las cabezas. Nótese la significancia en las dendritas LP cuando las comparamos con el resto. Tg-, espinas de dendritas Tg-; LP, espinas de dendritas que no están en contacto con las placas; TP, espinas pertenecientes a dendritas que están en contacto con una placa, sin el segmento que contacta con la placa; PP, espinas pertenecientes a segmentos que pasan por dentro de una placa. Barra de escala, 3 μm.

cular interna (CMI) y la capa molecular intermedia-externa (CME). Se encontró que la densidad de placas en la CMI fue  $3,00 \pm 0,25$  placas/100 μm<sup>3</sup> y en CME  $5,99 \pm 0,40$  placas/100 μm<sup>3</sup> (Figura 32G). La media del volumen ocupado por las placas fue  $5657 \pm 1488$  μm<sup>3</sup> en CMI y  $8719 \pm 1109$  μm<sup>3</sup> en CME ( $P > 0,05$ ), siendo el porcentaje de volumen ocupado por las placas  $1,59 \pm 0,39\%$  en CMI y  $5,15 \pm 0,60\%$  en CME.

#### 4.1.2.2 Alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas

Para el análisis morfológico (Figura 30) de las dendritas basales de las neuronas granulares del GD en la capa molecular se establecieron cuatro categorías de dendritas dependiendo de su relación con las placas Aβ (Figura 31A):

1. Dendritas controles (dendritas Tg-), pertenecientes a ratones controles Tg-.
2. Dendritas que no están en contacto con



**Figura 30. Inyecciones intracelulares en GD y análisis morfométrico.** Composición panorámica de imágenes tomadas con microscopio confocal de GD mostrando neuronas inyectadas con Alexa594 y placas marcadas con tioflavina-s en: (a) un ratón control Tg- y (b) un ratón APP/PS1. Imágenes de neuronas granulares de: (c) ratones Tg- y (d) ratones APP/PS1. (e) Un ejemplo de dendrita pasando por una placa. (f) Un ejemplo de dendrita en contacto con una placa. (g-i) Método utilizado para distinguir espinas y dendritas que pasan por placa. (g) Dendrita tocando una placa. (h) El borde de la placa (azul) es marcado con la herramienta IsoSurface del software Imaris. (i) Eliminación del borde de la placa dejando solo la dendrita. Este proceso fue llevado a cabo después de realizar las medidas sobre las imágenes en ciego. (j) Imagen de un segmento de una dendrita en ciego. (k) Imagen anterior con las cabezas marcadas. Imagen ampliada sin (l) y con (m) las cabezas marcadas. Barra de escala (a, b) 150  $\mu\text{m}$ , (c, d) 40  $\mu\text{m}$ , (e) 6  $\mu\text{m}$ , (f, j, k) 4  $\mu\text{m}$ , (g- i) 10  $\mu\text{m}$ , (l, m) 2,5  $\mu\text{m}$ .

las placas (dendritas LP).

3. Dendritas en contacto con placas (dendritas CP). Cuando una parte de la dendrita se encuentra localizada entre el borde de la placa y 0,2  $\mu\text{m}$  hacia el interior de la misma.

4. Dendritas que pasan por el interior de la placa (dendritas PP). Cuando una parte de la dendrita se encuentra localizada más de 0,2  $\mu\text{m}$  hacia el interior de la placa.

Examinamos las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de 462 y 235 neuronas granulares inyectadas en seccio-

nes de ratones APP/PS1 y ratones controles Tg- respectivamente (Figura 30). La densidad de espinas fue significativamente diferente entre las cuatro categorías de espinas ( $P=0,019$ , ANOVA de una vía, Figura 31B). Observamos una serie de alteraciones en la densidad de espinas en las dendritas relacionadas con placas: la densidad de espinas es menor en las dendritas PP, mientras que es mayor en las dendritas CP, cuando las comparamos con las dendritas LP y Tg- ( $PP=0,950 \pm 0,075$  espinas/ $\mu\text{m}$ ,  $P<0,001$ ;  $CP=2,05 \pm 0,13$  espinas/ $\mu\text{m}$ ,  $P<0,001$ ; Tg-

$=1,410 \pm 0,052$  espinas/ $\mu\text{m}$ ,  $n=9$ ; test de comparación múltiple *Newman-Keuls*). Las dendritas LP no mostraron diferencias ( $LP=1,521 \pm 0,047$  espinas/ $\mu\text{m}$ ,  $P>0,05$ ) con respecto a las dendritas Tg-. Tampoco cuando comparamos la densidad de espinas en función de la distancia al soma ( $P>0,5$ , Figura 31D).

Se comparó la densidad de espinas dendríticas de los segmentos que se encontraban en contacto y atravesando las placas, con la media de los segmentos de las dendritas Tg- a la misma distancia del soma. Encontramos una disminución en la densidad de espinas de aproximadamente 37% en los segmentos dendríticos que se encontraban atravesando las placas (PP) y un aumento de la densidad de espinas del 38% en los segmentos dendríticos que se encontraban en contacto con las placas (CP) (Figura 31E). Resumiendo, la densidad de espinas es mayor en los segmentos dendríticos en contacto con las placas (CP), menor en los segmentos que se encuentran atravesando las placas (PP) y se mantiene constante en las dendritas que no se encuentran en contacto con las placas (LP).

#### 4.1.2.3 Alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas

Para el análisis de las posibles diferencias en el volumen de la cabeza y en la longitud del cuello de las espinas (*vid.* § 3.2.5.1), también se establecieron cuatro categorías de espinas, dependiendo de su relación con las placas (Figura 32A) siguiendo el mismo criterio que en el apartado 4.1.2.2:

1. Espinas controles (espinas Tg-), pertenecientes a dendritas controles Tg-.
2. Espinas pertenecientes a dendritas que no están en contacto con las placas (espinas LP).
3. Espinas pertenecientes a dendritas en con-

tacto con placas (espinas CP).

4. Espinas pertenecientes a dendritas que pasan por el interior de la placa (espinas PP).

Encontramos cambios significativos entre las cuatro categorías de espinas cuando comparamos el volumen de la cabeza ( $P=0,0016$ , ANOVA de una vía, Figura 32B). La media del volumen de las cabezas fue significativamente menor ( $P<0,05$ , test de comparación *Newman-Keuls*) en las espinas LP ( $0,080 \pm 0,004 \mu\text{m}^3$ ;  $n= 9913$  espinas) y en las espinas CP ( $0,076 \pm 0,006 \mu\text{m}^3$ ;  $n= 443$  espinas), cuando las comparamos con las espinas PP ( $0,107 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$ ;  $n= 474$  espinas) y con las espinas Tg- ( $0,103 \pm 0,006 \mu\text{m}^3$ ;  $n= 10677$  espinas). A pesar de que la media del volumen de las cabezas fue similar en las espinas PP y en las espinas Tg-, el análisis de la distribución de las frecuencias reveló que el tamaño de las espinas entre los dos grupos era sustancialmente diferente (Figura 32C). Se analizaron las frecuencias de las espinas clasificadas según el tamaño de su cabeza (espinas de cabeza grande, volumen de la cabeza  $> 0,1 \mu\text{m}^3$ ; espinas de cabeza mediana, volumen de la cabeza  $0,05-0,1 \mu\text{m}^3$ ; espinas de cabeza pequeña, volumen de la cabeza  $< 0,05 \mu\text{m}^3$ ). Las espinas de cabeza grande representan el 23% de las espinas de las dendritas Tg- y el 14,4% en LP, lo que implica una disminución del 38% en la presencia de espinas de cabeza grande en zonas libres de placas y del 52% en las dendritas que están en contacto con la placa cuando las comparamos con Tg- (Figura 32D).

Los análisis de las medias de la longitud de los cuellos de las espinas dendríticas mostraron diferencias entre las cuatro categorías de espinas establecidas ( $P<0,0001$ , ANOVA de una vía, Figura 32E). Las espinas CP ( $0,540 \pm 0,026 \mu\text{m}$ ;  $P<0,05$  test de



comparación *Newman-Keuls*) y PP ( $0,634 \pm 0,028 \mu\text{m}$ ;  $P < 0,001$ ) presentaban mayor longitud del cuello que las espinas Tg- ( $0,443 \pm 0,012 \mu\text{m}$ ). Las espinas LP ( $0,455 \pm 0,035 \mu\text{m}$ ) no presentaban diferencias con respecto a las espinas Tg- (Figura 32F).

Resumiendo, hay una menor frecuencia de espinas de cabeza grande en las dendritas LP y CP que en las Tg-, mientras que la longitud del cuello de las espinas se mantiene constante en las dendritas LP y aumenta en las dendritas CP y PP cuando las comparamos con Tg-.

### 4.1.3 CA1

#### 4.1.3.1 Volumen ocupado por las placas

Se cuantificó la fracción de volumen ocupada (*vid.* § 3.2.4.1) por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total en el *stratum oriens* y en el *stratum radiatum* del hipocampo. El análisis reveló que esta fracción era relativamente pequeña ya que solo ocupaban un volumen de aproximadamente 1,4% ( $n=4$ ) en el *stratum oriens* y 1,6% ( $n=5$ ) en el *stratum radiatum*. Se encontró que la densidad de placas en el *stratum oriens* fue  $1138 \pm 214,4$  placas/ $\text{mm}^3$  y en el *stratum radiatum*  $1174 \pm 113,0$  placas/ $\text{mm}^3$ . La media del volumen ocupado por las placas fue  $0,019 \pm 0,002 \text{ mm}^3$  en el *stratum oriens* y  $0,029 \pm 0,0029 \text{ mm}^3$  en el *stratum radiatum*.

#### 4.1.3.2 Densidad y morfología de las espinas dendríticas

Examinamos las imágenes tomadas mediante microscopia confocal (*vid.* § 3.2.5.1) de 262 y 270 neuronas piramidales inyectadas en la capa piramidal de CA1 en secciones de cerebro de ratones APP/PS1 y ratones controles Tg- respectivamente (Figura 33A, B). El análisis morfológico de las espinas dendríticas pertenecientes a neuronas piramidales de CA1, se realizó tanto en las dendritas localizadas en el *stratum oriens*

(dendritas basales) como en las localizadas en el *stratum radiatum* (dendritas colaterales que surgen de la dendrita apical).

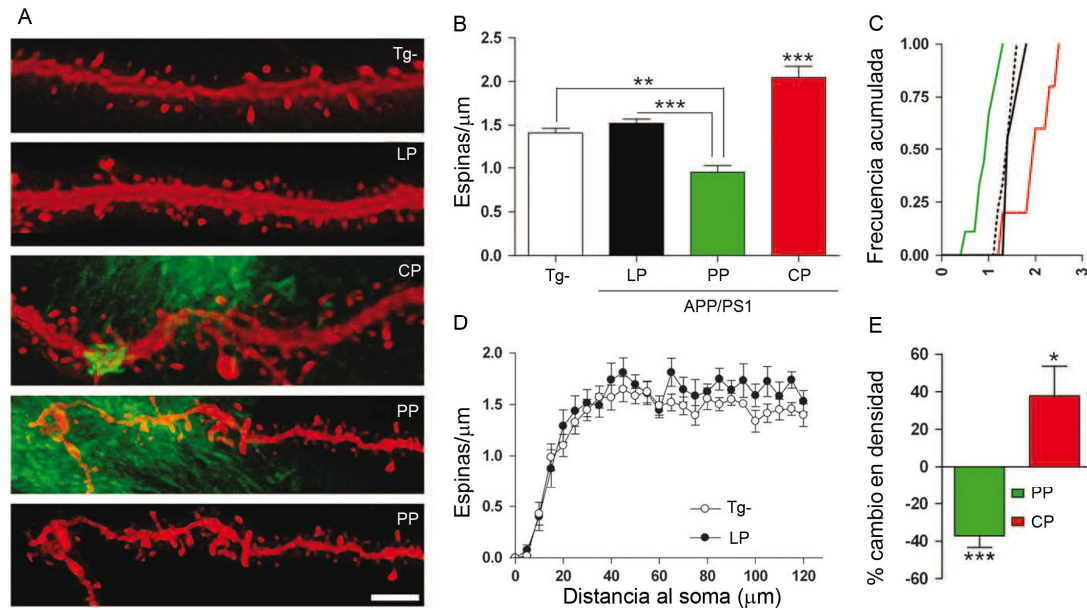
#### 4.1.3.2.1 *Stratum oriens*

Como se ha descrito, la fracción del volumen ocupada por las placas es muy pequeña. Aunque el número de neuronas inyectadas fue relativamente grande, no encontramos dendritas en contacto con placas en el *stratum radiatum* debido a la baja densidad de placas (1,4% en el *stratum oriens* y 1,6% en el *stratum radiatum*). Sin embargo, en el *stratum oriens* encontramos cinco dendritas en contacto con placas. De este modo para el análisis de la densidad de espinas en el *stratum oriens* se clasificaron las dendritas en:

1. Dendritas controles (dendritas Tg-), pertenecientes a ratones controles Tg-.
2. Dendritas pertenecientes al ratón APP/PS1 que no están en contacto con las placas (dendritas LP).
3. Segmentos de dendritas que pasan por el interior de la placa (PP).

Observamos que la densidad de espinas entre los tres grupos se encontraba alterada ( $P=0,006$ , ANOVA de una vía), apareciendo una disminución en la densidad de espinas en las dendritas que se encontraban atravesando placas (PP) ( $0,85 \pm 0,17$  espinas/ $\mu\text{m}$ ;  $n=4$ , Figura 33D), mientras que las dendritas LP ( $1,33 \pm 0,054$  espinas/ $\mu\text{m}$ ;  $n=7$ ) no mostraban diferencias con respecto a las dendritas Tg- ( $1,348 \pm 0,07$  espinas/ $\mu\text{m}$ ;  $n=6$ ). Además un análisis de la densidad de espinas dendríticas en función de la distancia al soma (análisis de Sholl), reveló que no existían diferencias en la densidad entre las dendritas LP y Tg- a lo largo de toda su longitud (Figura 33E).

Debido a la elevada pérdida de espinas dentro de las placas, las espinas dentro de las placas ( $n=31$  espinas, Figura 33C) no fue-



**Figura 31. Las dendritas que se encuentran relacionadas con las placas presentan alteraciones en la densidad de espinas dendríticas.** (A) Imágenes de las distintas categorías de dendritas utilizadas en el análisis. Tg-, dendrita perteneciente al ratón control Tg-; LP, dendrita APP/PS1 libre de placa; CP, dendrita APP/PS1 que toca placa; PP, (arriba) dendrita APP/PS1 que pasa por el interior de la placa, (abajo) dendrita PP sin la placa. (B) La densidad de espinas fue significativamente menor en las dendritas que atraviesan las placas y significativamente mayor en las dendritas en contacto con las placas. La densidad de espinas fue similar entre las dendritas Tg- y las que se encontraban en regiones libres de placas (LP). (C) Curvas de frecuencia acumulada mostrando menor densidad de espinas en las dendritas relacionadas con las placas. (D) Densidad de espinas como función de la distancia al soma fue similar en los ratones Tg- y en los ratones APP/PS1 en las regiones libres de placas (LP). (E) Para cada segmento dendrítico relacionado con una placa, se midió la distancia desde la placa al soma y se comparó la densidad de espinas para cada segmento con la densidad de espinas en los ratones Tg- en segmentos a la misma distancia. Barra de escala 3  $\mu\text{m}$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

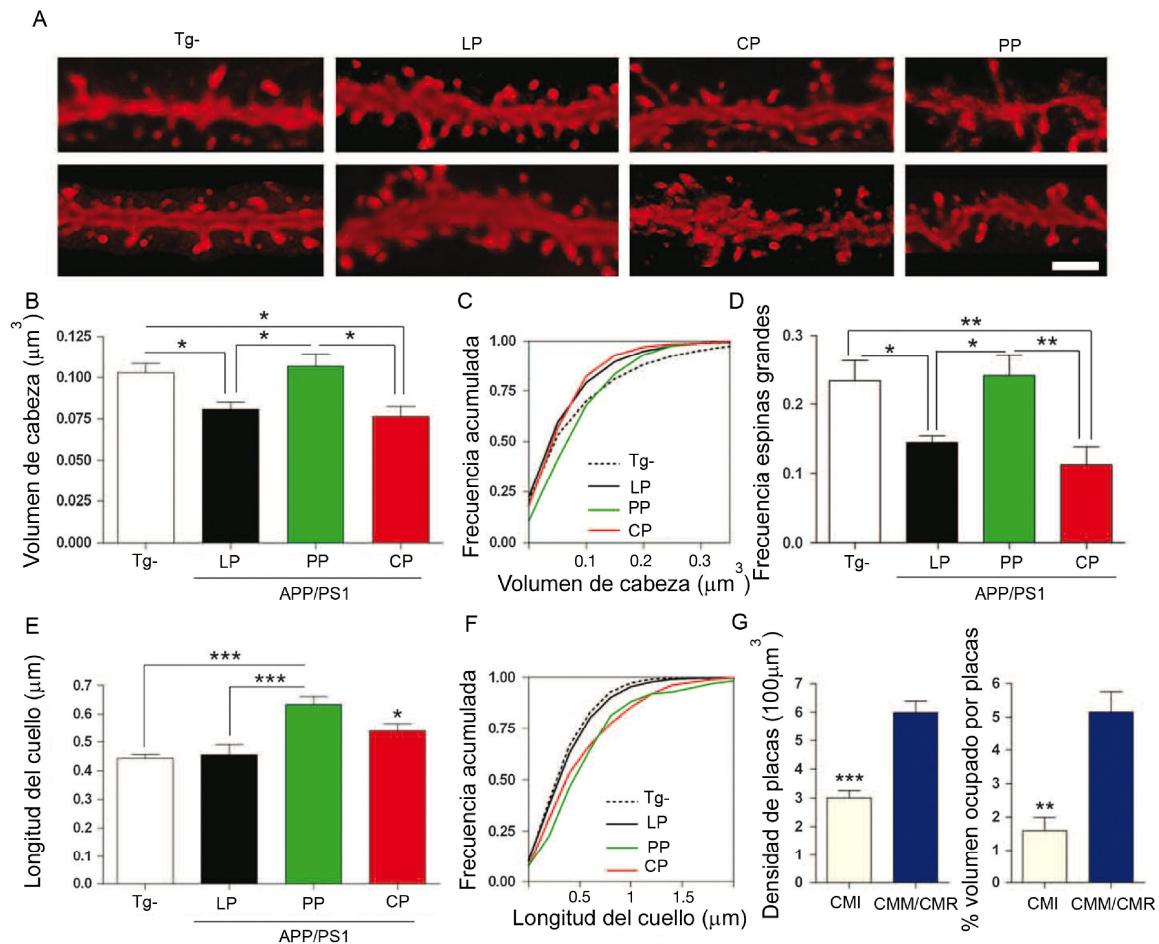
ron incluidas en los posteriores análisis. Se midió la longitud de los cuellos dendríticos y el volumen de la cabeza en tres dimensiones de las espinas dendríticas de las dendritas Tg- (espinas Tg-) y LP (espinas LP) (*vid.* § 3.2.5.1), apareciendo diferencias significativas en la media de la longitud de los cuellos dendríticos ( $P = 0,018$ , *t-test*, Figura 33F, G, H), mostrando que las espinas LP tenían cuellos más cortos ( $0,43 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ;  $n = 5145$  espinas) que las espinas Tg- ( $0,55 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ;  $n = 5709$  espinas). Sin embargo, los volúmenes de las cabezas no presentaban diferencias entre ambos grupos ( $0,05 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$  y  $0,05 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$  respectivamente;  $P = 0,88$ , *t-test*; Figura 33I, J, K).

#### 4.1.3.2.1 Stratum radiatum

Como se ha comentado anteriormente, en el *stratum radiatum* no encontramos ninguna dendrita que estuviera en contacto con una placa, por lo que las dendritas se clasificaron en (Figura 34A):

1. Dendritas controles (dendritas Tg-), pertenecientes a ratones controles Tg-.
2. Dendritas pertenecientes al ratón APP/PS1 que no están en contacto con las placas (dendritas LP).

Se estudió la densidad de espinas y la morfología de las espinas dendríticas de las dendritas colaterales Tg- (espinas Tg-) y Lp (espinas LP). Todas las dendritas incluidas en el análisis se encontraban localizadas a menos de 300  $\mu\text{m}$  de la capa piramidal (cuerpos celulares), excluyendo del análisis

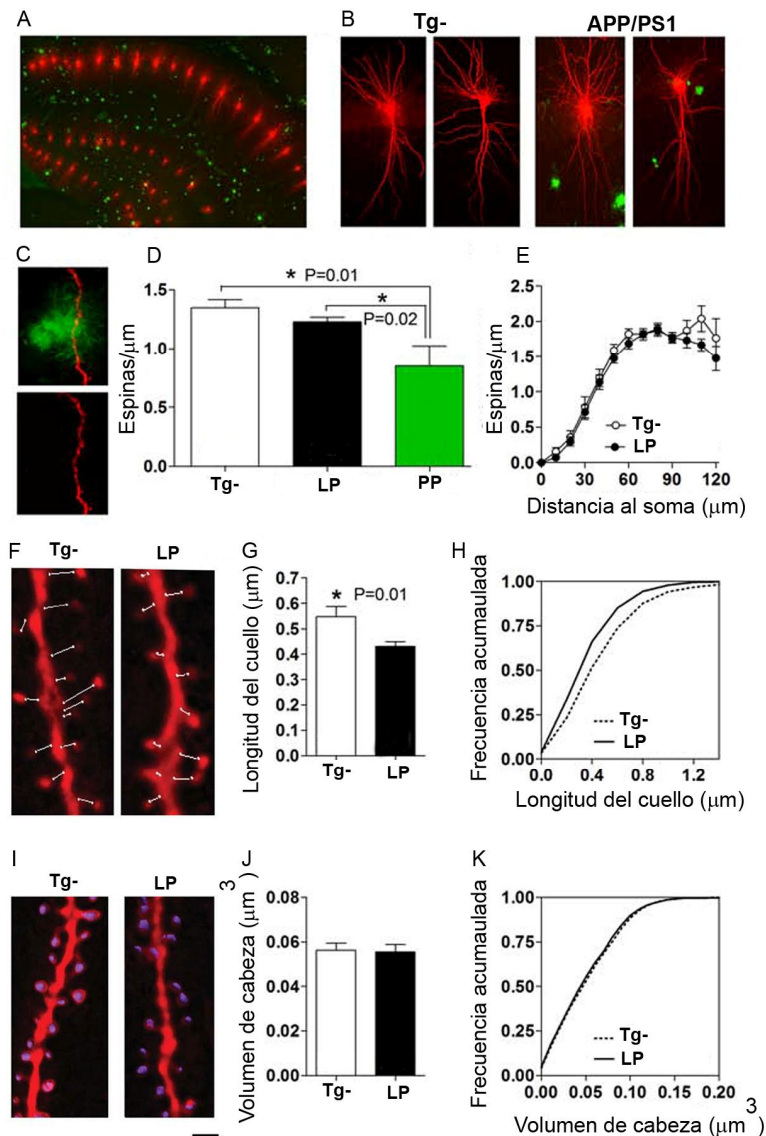


**Figura 32. Las espinas que se encuentran dentro y fuera de las placas presentan alteraciones morfológicas.** (A) Imágenes tomadas con microscopio confocal de los distintos tipos de espinas utilizados en este estudio. Nótese la gran variación de la morfología entre los distintos grupos. Tg-, espinas pertenecientes a dendritas Tg-; LP, espinas libres de placas; CP, espinas que tocan placa; PP, espinas que pasan por el interior de la placa. (B) Disminución del volumen medio de las cabezas de las espinas libres de placas. (C) Frecuencias acumuladas mostrando la distribución de los volúmenes de las cabezas. (D) La frecuencia de espinas grandes está sustancialmente reducida fuera de las placas. (E) Gráfico de barras mostrando que las espinas que pasan por las placas tienen cuellos mayores. (F) Frecuencias acumuladas mostrando la distribución de las longitudes de los cuellos. (G) A la izquierda, densidad de placas en la capa molecular del giro dentado. A la derecha, fracción de volumen ocupada por las placas. Barra de escala 2  $\mu\text{m}$ . CMI, capa molecular interna, CMM/CMR, capa molecular externa.

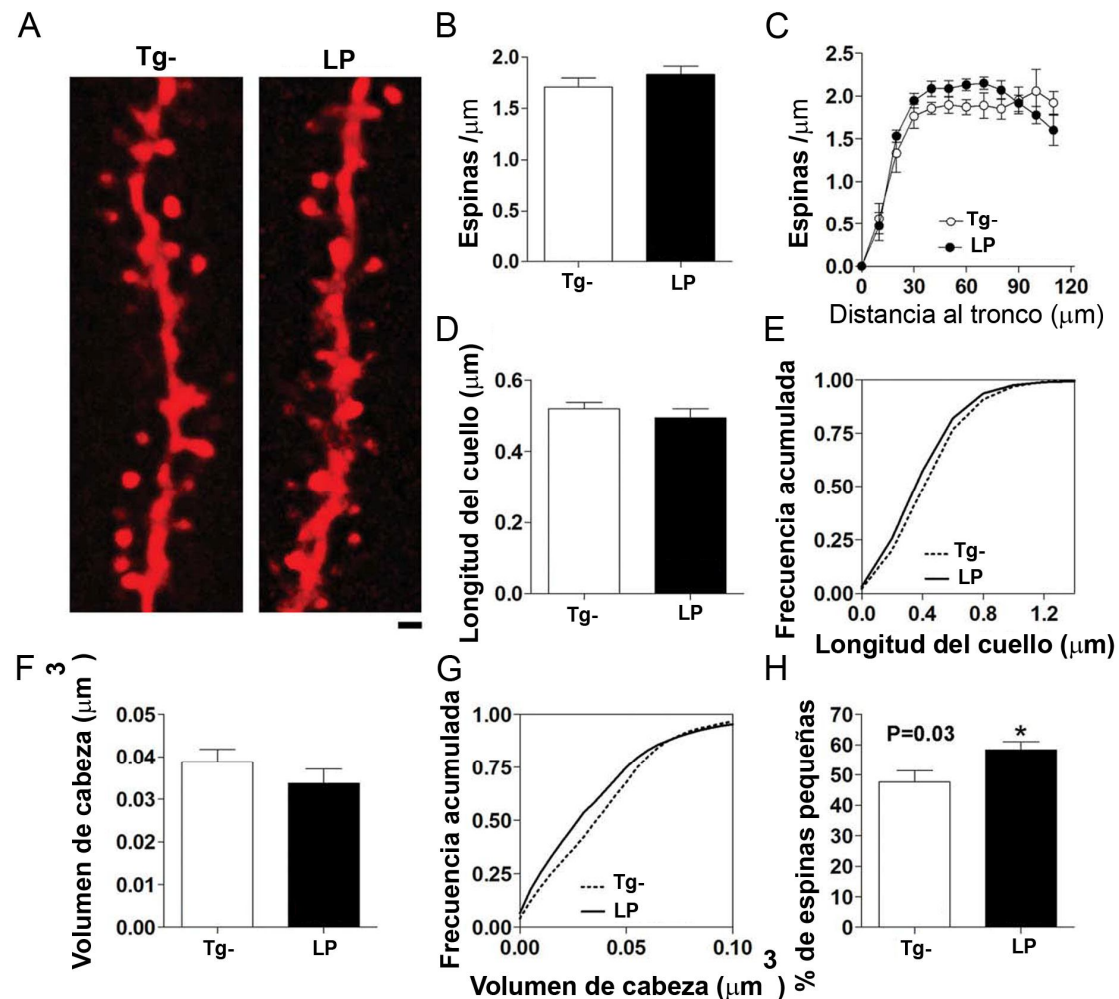
\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

las dendritas localizadas en el *stratum lacunosum-moleculare*. Un análisis estadístico de las medias de las densidades de las espinas dendríticas (Figura 34B) mostró que no existían cambios en las dendritas LP ( $1,83 \pm 0,08$  espinas/ $\mu\text{m}$ ) cuando las comparamos con las dendritas Tg- ( $1,71 \pm 0,08$  espinas/ $\mu\text{m}$ ;  $P=0,62$ , *t-test*). Tampoco en la densidad de espinas en función de la distancia al soma (Figura 34C). No aparecieron diferencias significativas cuando comparamos la

longitud del cuello dendrítico (Figura 34A) entre las dendritas LP ( $0,494 \pm 0,024 \mu\text{m}$ ) y las dendritas Tg- ( $0,519 \pm 0,017 \mu\text{m}$ ) ( $P=0,43$ , *t-test*; Figura 34D, E). Ni, cuando comparamos los volúmenes de las cabezas entre los grupos LP ( $0,033 \pm 0,003 \mu\text{m}^3$ ;  $n=6044$  espinas) y Tg- ( $0,038 \pm 0,003 \mu\text{m}^3$ ;  $n=4437$  espinas) ( $P=0,29$ , *t-test*, Figura 34F). Sin embargo, un análisis de sus frecuencias (Figura 34G), mostró un aumento significativo (29%,  $P=0,01$ , *t-test*) en la frecuencia de espinas de



**Figura 33. Las espinas dendríticas son más cortas en el *stratum oriens* del ratón APP/PS1.** (A) Vista panorámica de neuronas inyectadas con Alexa594 (rojo) y placas teñidas con tioflavina-s (verde) en el hipocampo de un ratón APP/PS1. (B) Imágenes de neuronas inyectadas y placas en ratón Tg- (izquierda) y ratón APP/PS1 (derecha). Un análisis en tres dimensiones, mostró que las dendritas del *stratum radiatum* (dendritas colaterales) se encuentran cerca de las placas marcadas, pero no en contacto con ellas. (C) Un ejemplo de una dendrita del *stratum oriens* pasando a través de una placa en la que se observa poca densidad de espinas en el segmento de la dendrita en el interior de la placa. (D) La densidad de espinas se encuentra significativamente disminuida dentro de las placas (PP). Nótese que la densidad de espinas es similar en el ratón Tg- y en la región libre de placas del ratón APP/PS1 (LP). (E) La densidad de espinas en función de la distancia al soma (análisis de Sholl) es similar en las dendritas Tg- y dendritas LP. Nótese que la densidad de espinas es similar a lo largo de toda la dendrita. (F) Imágenes de dendritas procedentes de ratón Tg- y ratón APP/PS1 (LP). Los cuellos se encuentran marcados como fueron medidos para el análisis. (G) Disminución de la longitud de los cuellos para las espinas LP. (H) Curva de la frecuencia acumulada que muestra la distribución de las longitudes de los cuellos, indicando valores menores para las espinas LP. (I) Imágenes de segmentos dendríticos con las medidas (morado) obtenidas para calcular el volumen de las cabezas. (J-K) El volumen de la cabeza y su distribución de frecuencia acumulada fue similar para las dendritas Tg- y LP. Barra de escala 250 μm (A), 25 μm (B), 5 μm (C), 0,6 μm (F), 0,8 μm (I). \* $P < 0,05$ .



**Figura 34. Incremento en la frecuencia de espinas de cabeza pequeña en el *stratum radiatum* del ratón APP/PS1.** (A) Imágenes de dendritas procedentes de ratones Tg- y APP/PS1. (B) La densidad de espinas es similar en dendritas Tg- y dendritas libres de placas (LP). (C) La densidad de espinas como función de la distancia al tronco de la dendrita apical no presentó diferencias significativas entre dendritas Tg- y dendritas LP. (E) Curva de frecuencia acumulada mostrando la distribución de la longitud de los cuellos dendríticos, indicando que ambas poblaciones tienen igual distribución. (F) Gráfica de barras mostrando que no aparecen diferencias significativas entre las espinas Tg- y LP cuando comparamos las medias de los volúmenes de las cabezas. (G) Curva de frecuencia acumulada mostrando menor tamaño de cabeza en espinas LP. (H) Gráfica de barras mostrando aumentos significativos en la frecuencia de espinas pequeñas (volumen < 0,03  $\mu\text{m}^3$ ) en el *stratum radiatum* del ratón APP/PS1. Barra de escala, 0,6  $\mu\text{m}$ .



cabeza pequeña (volumen < 0,03  $\mu\text{m}^3$ ) en las dendritas LP (Figura 34H).

En resumen, en ningún caso existe alteración en la densidad de espinas pero las espinas localizadas en el *stratum oriens* muestran una menor longitud de sus cuellos, mientras que las espinas del *stratum radiatum* presentan una mayor frecuencia de espinas de cabeza pequeña. Es decir, las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1 en el modelo APP/PS1 muestran distintas alteraciones morfológicas dependiendo del estrato donde se encuentren.

#### 4.2 Patología neurofibrilar

Previo al análisis de las posibles alteraciones microanatómicas de las células piramidales de CPH y CA1 debido a la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en su soma, evaluamos el grado de afectación del paciente de EA con respecto a la patología amiloide:

##### 4.2.1 Volumen ocupado por las placas

Calculamos la fracción de volumen ocupada por las placas A $\beta$  (Figura 19B, 20B, F) con respecto al volumen total en la capa III de la CPH (Figura 35B) (*vid.* § 3.2.4.1) y observamos que era relativamente pequeño, ya que solamente representaba un 11% del volumen total (Figura 35B). La densidad de placas en la CPH fue 3347 placas/mm<sup>3</sup> (Figura 35A) y el volumen medio por placa 32995  $\mu\text{m}^3$ . También se cuantificó la fracción de volumen ocupada por las placas A $\beta$  con respecto al volumen total en la capa piramidal de CA1 (Figura 35F). En este caso, la densidad de placas en CA1 fue 423 placas/mm<sup>3</sup> (Figura 35A) y el volumen medio por placa 219376  $\mu\text{m}^3$ , siendo el porcentaje de volumen ocupado por las placas, solo un 9,27 % del volumen total (Figura 35B).

##### 4.2.2 Porcentaje de neuronas PHF-tau-ir

Se cuantificó la densidad neuronal total y la densidad de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir (*vid.* §

3.2.4.2; Figura 20C, G) y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir (*vid.* 3.2.4.2; Figura 20D, H) en la capa III de la CPH y en la capa piramidal de CA1. Los resultados se mostraron como porcentaje de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir con respecto a la densidad de neuronas totales (Figura 35 C, D). En la capa III de la CPH, encontramos que la densidad neuronal total fue 19560 neuronas/mm<sup>3</sup>, mientras que la densidad de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir fue 291 y 499, respectivamente. De este modo, los porcentajes de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir con respecto al número total de neuronas fue 11% y 2,5%, respectivamente. En el caso de CA1, la densidad neuronal total de la capa piramidal de CA1 fue 15786 neuronas/mm<sup>3</sup>, mientras que la densidad de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir fue 6356 y 4356 por mm<sup>3</sup>, respectivamente. El porcentaje de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir con respecto al número total de neuronas fue 40% y 28%, respectivamente.

#### 4.2.3 Análisis morfológico de las neuronas inyectadas con LY

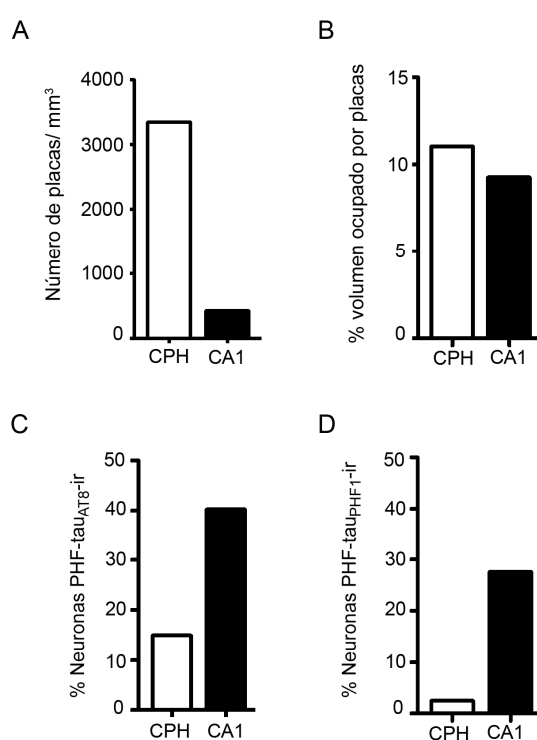
##### 4.2.3.1 Consideraciones metodológicas

El número de neuronas inyectadas que expresan la proteína PHF-tau<sub>AT8</sub> es mucho menor que el número de neuronas inyectadas control. Esto se debe a que las neuronas control son mas numerosas y a limitaciones técnicas que impiden conocer de antemano si las células inyectadas se encuentran o no afectadas por la patología neurofibrilar, hecho que se hará evidente tras el posterior marcaje con PHF-tau<sub>AT8</sub>. Por este motivo, y con el fin de que el número de dendritas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> sea lo más homogéneo posible, el grupo de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir limita el número de neuronas control a utilizar en el análisis.

Tras el análisis cuantitativo de las dendritas, las secciones se incubaron en una

solución que contenía tioflavina-s (*vid.* § 3.2.3.3) para averiguar si alguna de las dendritas incluidas en el análisis se encontraba tocando una placa de A $\beta$ . De todas las dendritas analizadas, sólo dos dendritas de CA1 y ninguna en la CPH, se encontraban tocando una placa de A $\beta$  (Figura 36). Estas dendritas se eliminaron de los análisis.

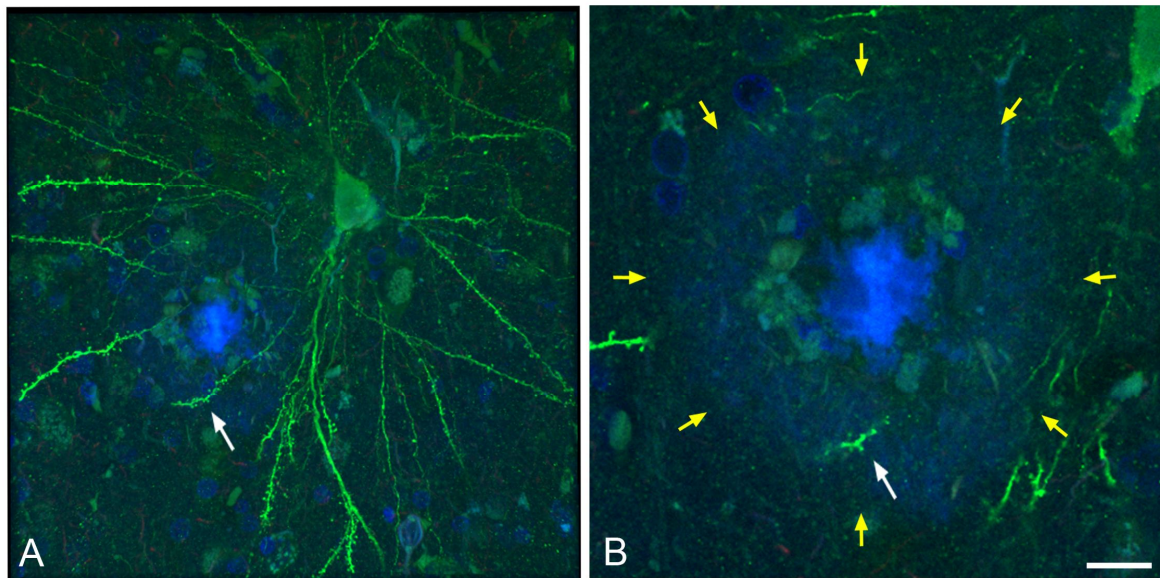
Desde los estudios iniciales de Alzheimer (1911) numerosos autores han propuesto distintas clasificaciones para describir los distintos tipos de marcaje en neuronas PHF-tau-ir (Baner et al., 1989; Braak et al., 1994). En general, los estadios iniciales están caracterizados por la presencia de pequeños agregados fibrilares que se van empaquetando hasta formar el clásico ovillo neurofibrilar (NF), típico de estadios finales de daño neuronal. En estudios previos en nuestro laboratorio (Blazquez-Llorca et al. 2010) se establecieron dos patrones de marcaje (patrón I y II) para las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir, según presenten o no NF en el soma. Neuronas con patrón I; son aquellas neuronas que muestran un marcaje citoplasmático difuso, con presencia o no de algunos agregados fibrilares de tamaño pequeño y con morfología neuronal aparentemente normal. Las neuronas con patrón II son las que presentan NF de forma notable. En el presente estudio, se han diferenciado las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir en los dos patrones descritos anteriormente por Blazquez-Llorca et al. (Figura 37), pero el patrón II lo hemos subdividido en tres subgrupos distintos (patrón IIa, IIb, IIc), con el fin de analizar con mayor detalle la posible correlación entre las alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas y la acumulación de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal. Esta subdivisión se realizó en función de la presencia moderada, abundante y prácticamente completa de tioflavina-s en el soma, respectiva-



**Figura 35.** Gráficos que muestran (A) el número de placas por volumen, (B) el porcentaje del volumen ocupado por las placas, (C) el porcentaje de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y (D) PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir con respecto a la densidad neuronal total en CPH y CA1.

mente. El patrón IIc representa el clásico NF, característico de los estadios finales de la patología neurofibrilar (Figura 37 J-L).

Mediante doble marcaje con PHF-tau<sub>AT8</sub> y LY diferenciamos dos tipos de neuronas inyectadas: las que no presentaban marcaje PHF-tau<sub>AT8</sub> somático (neuronas control) y las que presentaban marcaje PHF-tau<sub>AT8</sub> somático (neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir; Figuras 37–41). El marcaje PHF-tau<sub>AT8</sub> se observó en el soma, prolongaciones proximales y en las porciones distales de algunas dendritas de estas neuronas (Figuras 37, 40G-L y 41). Nunca encontramos marcaje de PHF-tau<sub>AT8</sub> en segmentos intermedios de las dendritas ni en las espinas dendríticas. Así, se establecieron dos categorías de dendritas dependiendo de la presencia o no de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma de la neurona en las neuronas



**Figura 36. Identificación de las dendritas que se encuentran en contacto con placas A $\beta$  en el paciente de EA.** (A) Imagen tomada con microscopio confocal (proyección de una serie de 15 imágenes) de una neurona de capa III de la CPH inyectada con LY y teñida con tioflavina-s. En esta imagen se observa una dendrita que se encuentra en contacto (flecha blanca) con la parte periférica de una placa de A $\beta$  que se visualizó en color azul. (B) Detalle a mayor aumento de la misma neurona obtenida con un solo plano confocal para comprobar que la dendrita se encuentra dentro de los límites de la placa (flechas amarillas). Barra de escala (A) 20  $\mu$ m, (B) 10  $\mu$ m.

piramidales de la capa III de la CPH y de CA1 (Figura 38, 39):

1. Dendritas “control” sin PHF-tau<sub>AT8</sub>, PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> (pertenecientes a somas neuronales no PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir).
2. Dendritas “patológicas” PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> (pertenecientes a somas neuronales PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir).

En la CPH (Figura 38), de las 96 células inyectadas 85 eran control y 11 eran neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir. Cuando analizamos el patrón de tinción del anticuerpo PHF-tau<sub>AT8</sub> en secciones doblemente marcadas con LY y PHF-tau<sub>AT8</sub> se observó que de las 6 neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir aptas para ser analizadas, 4 presentaban patrón I y 2 presentaban patrón IIa (Figura 40). En el caso de CA1 (Figura 39), de las 40 células inyectadas 34 eran control y 6 eran neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir. Cuando analizamos el patrón de tinción se observó que 3 de las neuronas analizadas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir presentaron patrón IIb y las otras 3 presentaron patrón IIc (Figura 41).

Tanto en la CPH como en CA1 (Figura 42), los parámetros morfológicos analizados en las dendritas basales de las neuronas control y de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir fueron: diámetro dendrítico, densidad, longitud y volumen de las espinas dendríticas.

#### 4.2.3.2 Análisis morfométrico en CPH

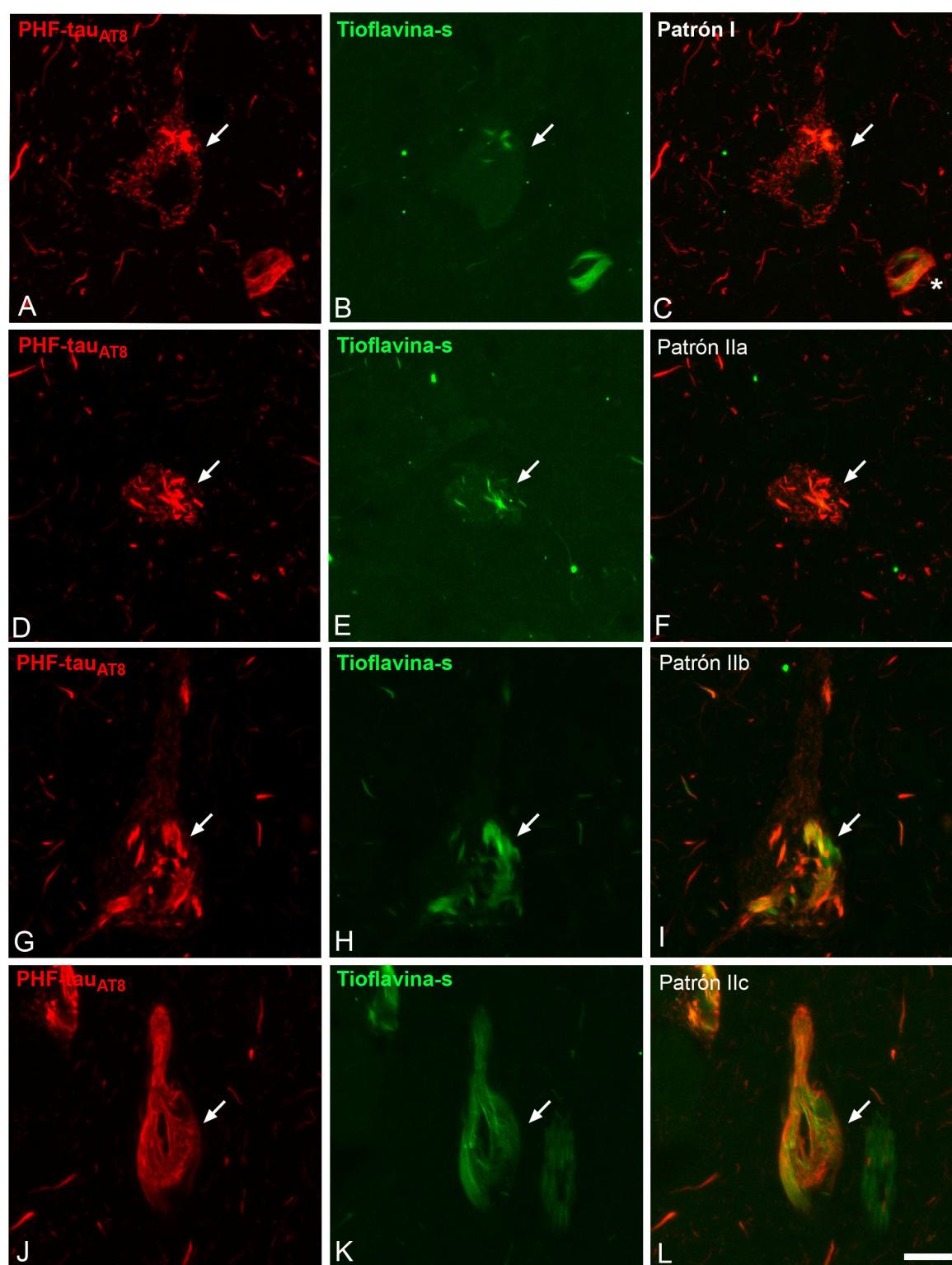
##### Diámetro dendrítico

No encontramos diferencias significativas cuando analizamos el diámetro dendrítico en función de la distancia al soma ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 43A). Tampoco cuando comparamos las medias del diámetro por dendrita entre las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> ( $0,961 \pm 0,087 \mu\text{m}$ ,  $n=12$ ) y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> ( $0,921 \pm 0,040 \mu\text{m}$ ,  $n=14$ ,  $P=0,44$ , test *Mann-whitney*, Figura 43B).

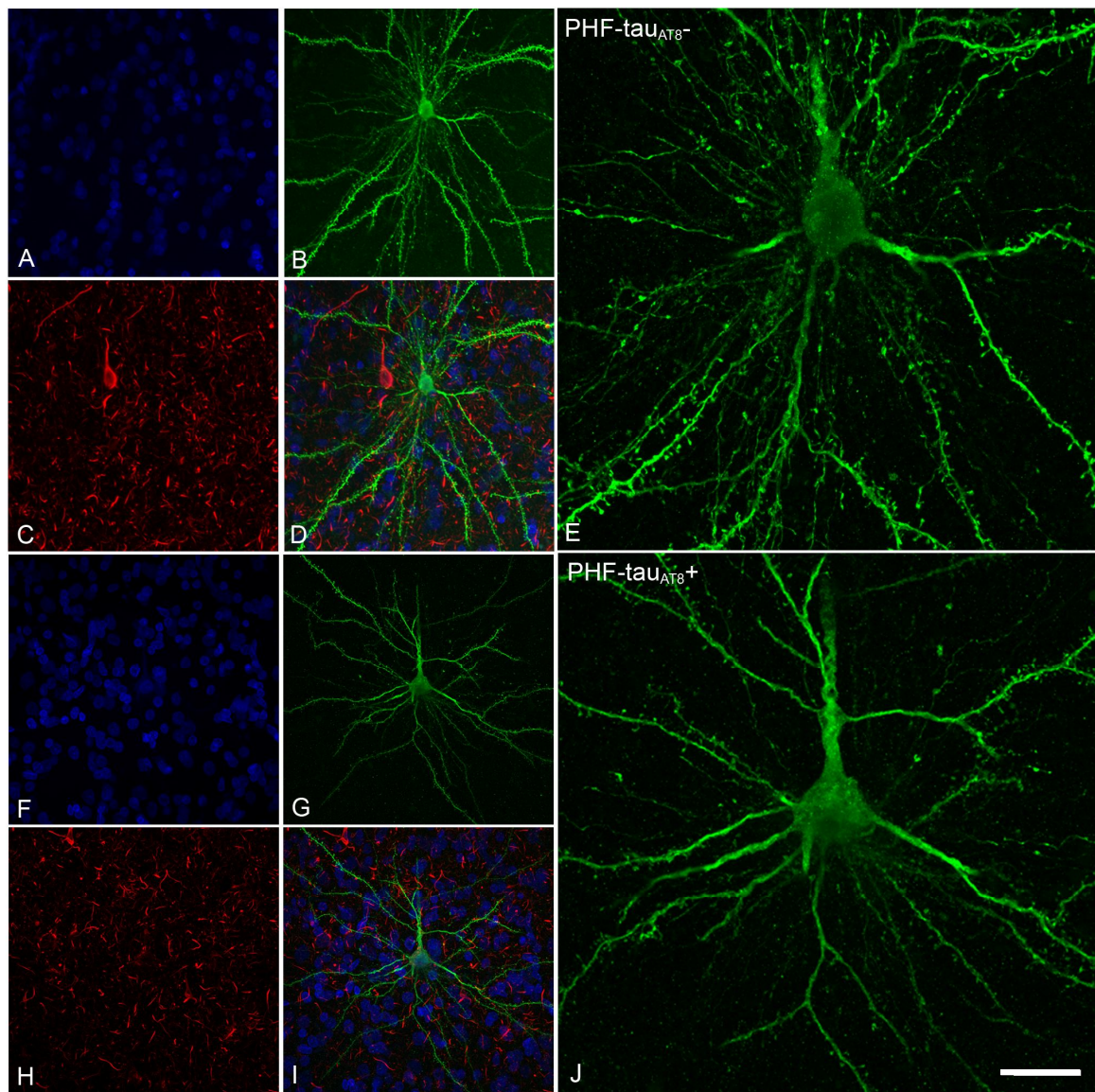
##### Densidad de espinas dendríticas

No se encontraron diferencias significativas en la densidad de espinas entre las dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>.





**Figura 37.** Imágenes obtenidas con un microscopio confocal para ilustrar neuronas (señaladas con una flecha) en CPH (A-F) y CA1 (G-L) doblemente marcadas con (A, D, G, J) PHF-tau<sub>AT8</sub> en color rojo y (B, E, H, K) tioflavina-s en color verde. (C, F, I, L), son imágenes de proyección (15-38 planos focales) combinando las imágenes A-B, D-E, G-H y J-K respectivamente. Nótese en la imagen C, la presencia de una neurona con patrón IIc (señalada con un asterisco). Barra de escala, 10  $\mu$ m.



**Figura 38. Series de imágenes obtenidas con microscopio confocal para mostrar neuronas inyectadas en la capa III de la CPH. (A-D)** Proyección de una serie de 26 imágenes (cada panel) para mostrar una neurona cuyo soma no expresa PHF-tau<sub>AT8</sub>. **(F-I)** Proyección de una serie de 28 imágenes para ilustrar una neurona cuyo soma contiene PHF-tau<sub>AT8</sub>. **(A, F)** Marcaje con DAPI para la visualización de los núcleos celulares. **(B, G)** Neuronas inyectadas con LY. **(C, H)** Inmunotinción con PHF-tau<sub>AT8</sub> para determinar si las neuronas inyectadas presentaban (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>) o no (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>) marcaje en su soma. **(D, I)** Imágenes de proyección combinando las imágenes A-C y F-H, respectivamente. Nótese en el caso del panel I, que se observa marcaje con PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir en el interior de la neurona inyectada (*vid.* § Fig. 40 para mayor detalle), mientras que en el caso del panel D, no existe dicho marcaje. **(E-J)** Mayor aumento de las imágenes B y G, respectivamente. Barra de escala, (A-D, F-I) 40  $\mu$ m, (E, J) 15 $\mu$ m.

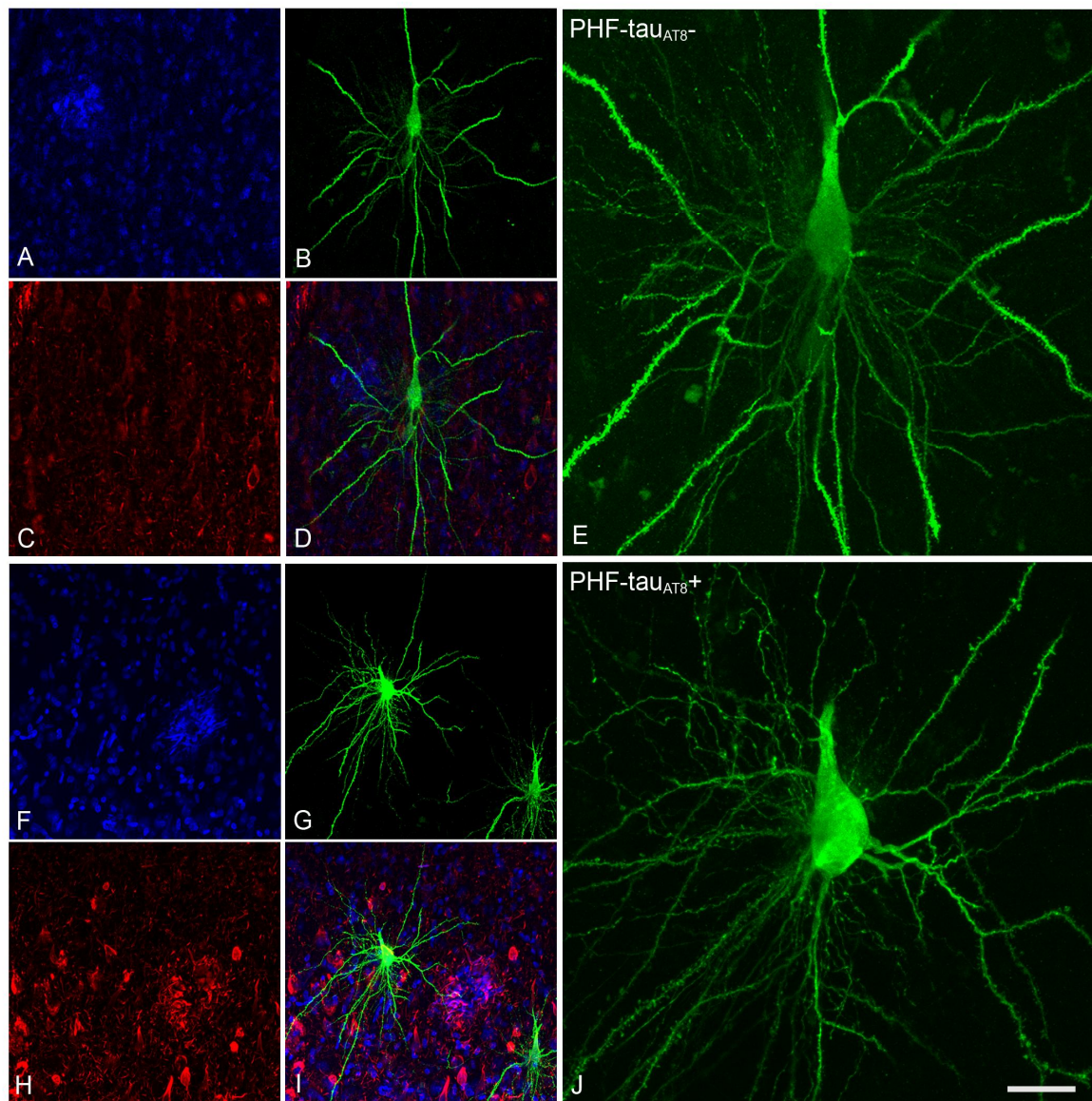
cuando analizamos la densidad de espinas con respecto a la distancia al soma ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 43C). Tampoco cuando comparamos las medias de la densidad por dendrita (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>:  $1,278 \pm 0,435$  espinas/ $\mu$ m,

$n=12$ ; PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>:  $1,229 \pm 0,344$  espinas/ $\mu$ m,  $n=14$ ;  $P=0,857$ , test *Mann-whitney*, Figura 43D).

#### Longitud de las espinas dendríticas

Al comparar la longitud de las espinas en

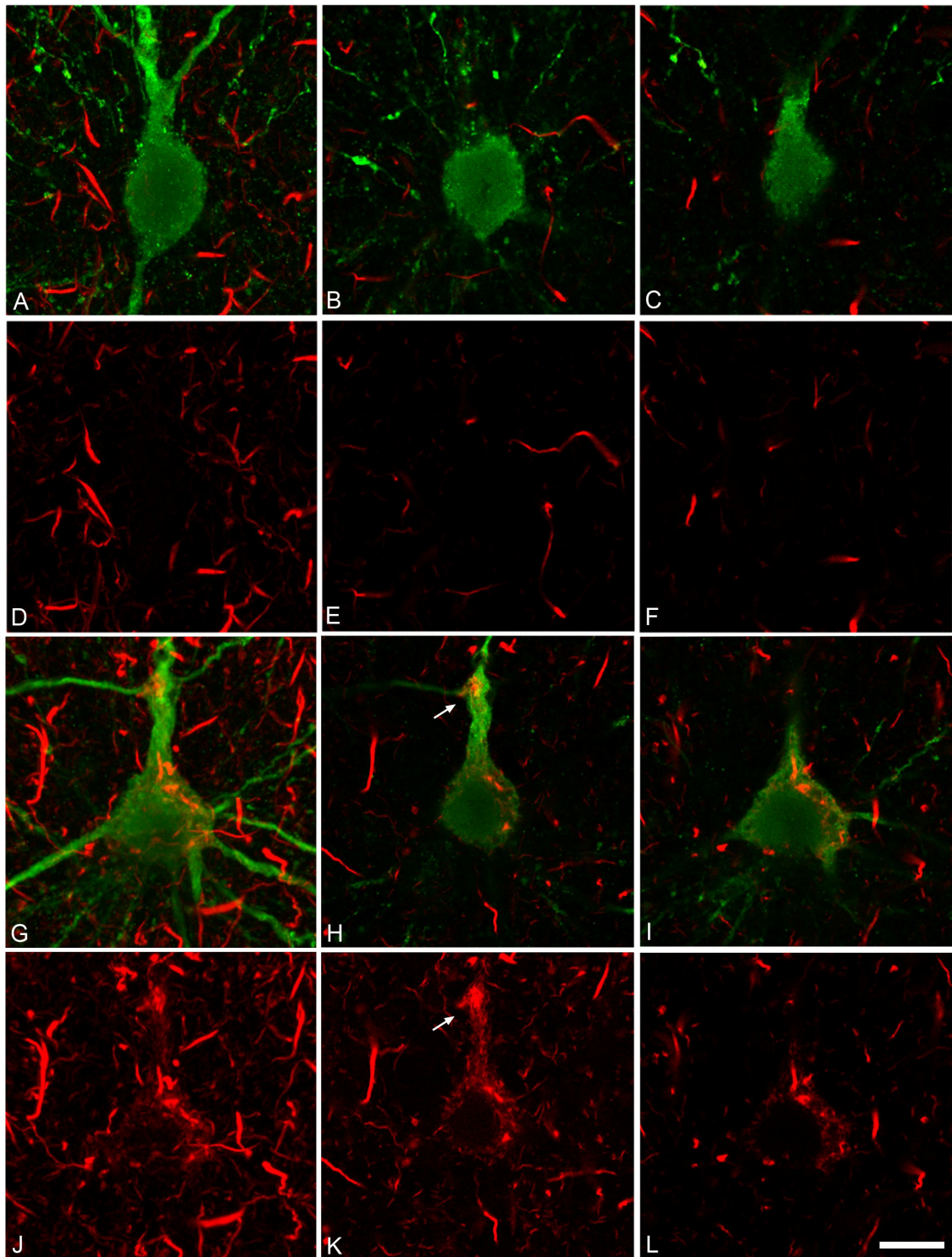




**Figura 39. Series de imágenes obtenidas con microscopio confocal para ilustrar neuronas inyectadas en la capa piramidal de la región CA1. (A-D)** Proyección de una serie de 16 imágenes (cada panel) para mostrar una neurona cuyo soma no contiene PHF-tau<sub>AT8</sub>. **(F-I)** Proyección de una serie de 21 imágenes para ilustrar una neurona cuyo soma contiene PHF-tau<sub>AT8</sub>. **(A, F)** Marcaje con DAPI para la visualización de los núcleos celulares. **(B, G)** Neuronas inyectadas con LY. **(C, H)** Inmunotinción con PHF-tau<sub>AT8</sub> para determinar si las neuronas inyectadas presentaban (PHF-tau<sub>AT8</sub>+) o no (PHF-tau<sub>AT8</sub>-) marcaje en su soma. **(D, I)** Imágenes de proyección combinando las imágenes A-C y F-H, respectivamente. Nótese en el caso del panel I que se observa marcaje con PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir en el interior de la neurona inyectada (*vid.* Fig. 41 para mayor detalle), mientras que en el caso del panel D no aparece dicho marcaje en el interior neuronal. **(E-J)** Mayor aumento de las imágenes B y G, respectivamente. Barra de escala, (A-D, F-I) 40  $\mu$ m, (E, J) 15  $\mu$ m.

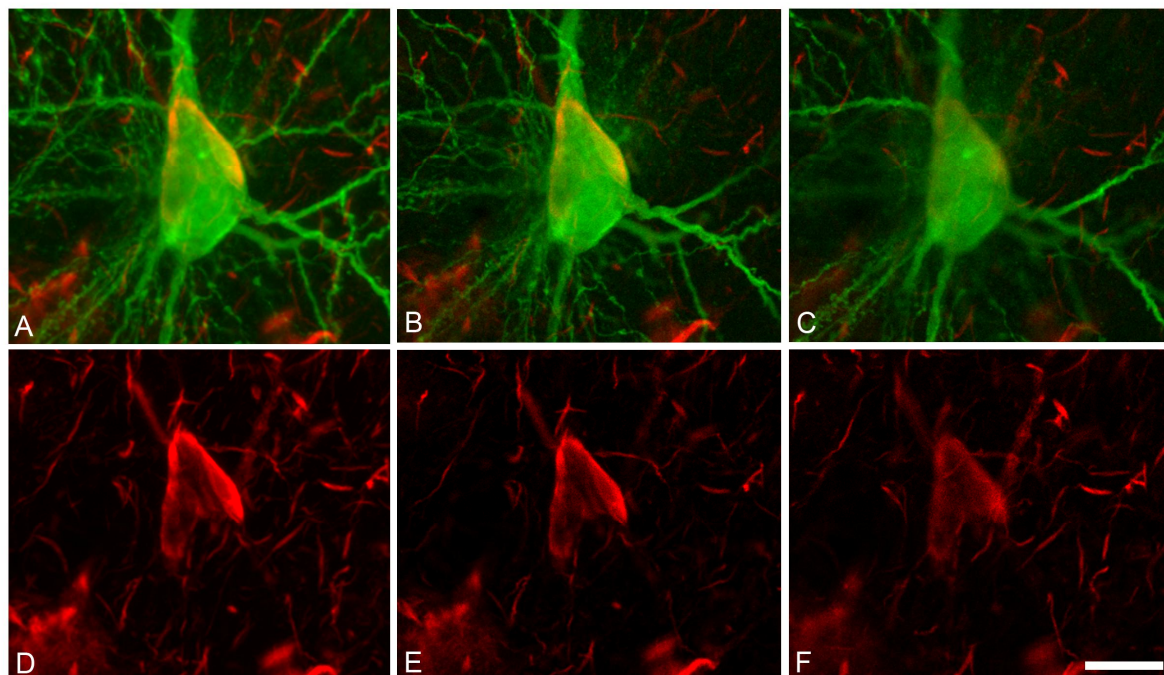
función de la distancia al soma en las dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>+ y PHF-tau<sub>AT8</sub>- tampoco encontramos diferencias significativas ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 43E). También analizamos la media de la longi-

tud de las espinas por dendrita entre los grupos PHF-tau<sub>AT8</sub>+ ( $1,499 \pm 0,154 \mu\text{m}$ ,  $n=12$ ) y PHF-tau<sub>AT8</sub>- ( $1,437 \pm 0,162 \mu\text{m}$ ,  $n=14$ ,  $P=0,86$ , test *Mann-whitney*, Figura 43F) y las frecuencias relativas acumuladas de la longitud de las espinas (neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>+



**Figura 40.** Detalles de las neuronas inyectadas intracelularmente mostradas en las Fig. 38E y 38J, para ilustrar la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal (marcaje Patrón IIa) en CPH. (A, D) Proyección de una serie de 16 imágenes del soma neuronal de una célula piramidal combinando (A) los canales rojo y verde y (D) solo el canal rojo donde podemos observar que no existe PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal. (B, C, E, F) Imágenes obtenidas con un solo plano confocal. (G, J) Proyección de una serie de 22 imágenes del soma neuronal de una célula piramidal combinando (G) los canales rojo y verde y (J) solo el canal rojo donde podemos observar la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal y parte proximal de la dendrita apical. (H, I, K, L) Imágenes obtenidas con un solo plano confocal. Nótese en E, la acumulación de PHF-tau<sub>AT8</sub> en la parte proximal de la dendrita apical, en el lugar de origen de una colateral (flecha). Barra de escala, 10  $\mu$ m.





**Figura 41. Detalle de la neurona inyectada intracelularmente mostrada en la Fig. 39J para ilustrar la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal (patrón IIc) en CA1. (A, D)** Proyección de una serie de 21 imágenes del soma neuronal de la célula piramidal combinando (A) los canales rojo y verde y (D) solo el canal rojo. (B, C, E, F) Imágenes obtenidas con un solo plano confocal. Nótese la presencia de un NF en el soma. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

2577 espinas y neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>: 2810 espinas,  $P > 0,1$ , test *Kolmogorov-Smirnov*, Figura 43I). En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas. Por último, las espinas fueron subdivididas con respecto a su longitud en dos grupos arbitrarios: espinas cortas (longitud  $\leq 0,99 \mu$ m) y espinas largas (longitud  $\geq 1 \mu$ m). En las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> las espinas cortas representaron un 35,52% de las espinas totales, mientras que en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> este valor fue un 34,23%.

#### Volumen de las espinas dendríticas

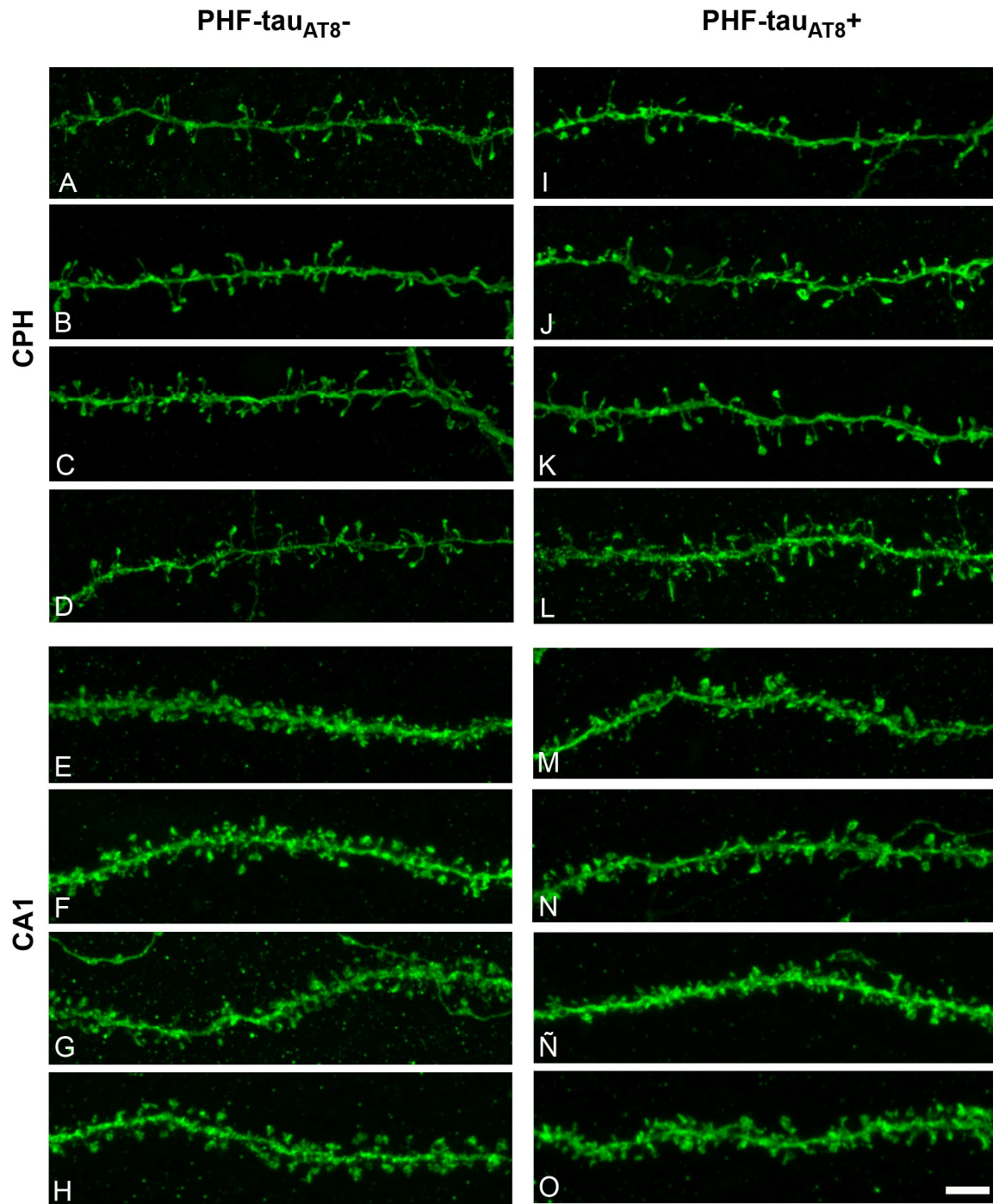
No se encontraron diferencias significativas cuando comparamos los volúmenes de las espinas en función de la distancia al soma entre las del grupo PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 43G). Tampoco cuando comparamos las medias de los volúmenes por dendrita (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>: 0,332

$\pm 0,019 \mu$ m<sup>3</sup>,  $n=12$ ; PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>: 0,328  $\pm 0,012 \mu$ m<sup>3</sup>,  $n=14$ ;  $P=0,96$ , test *Mann-whitney*, Figura 43H), ni en el análisis de sus frecuencias relativas acumuladas ( $P > 0,1$ , test *Kolmogorov-Smirnov*, Figura 43J). Por último, las espinas fueron subdivididas con respecto a su volumen en dos grupos arbitrarios: espinas pequeñas (volumen  $\leq 0,49 \mu$ m<sup>3</sup>) y espinas largas (volumen  $\geq 0,5 \mu$ m<sup>3</sup>). En las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> las espinas pequeñas representaron un 77,47% de las espinas totales, mientras que en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> este valor fue 78,67%.

#### **4.2.3.3 Análisis morfométrico en CA1**

##### Diámetro dendrítico

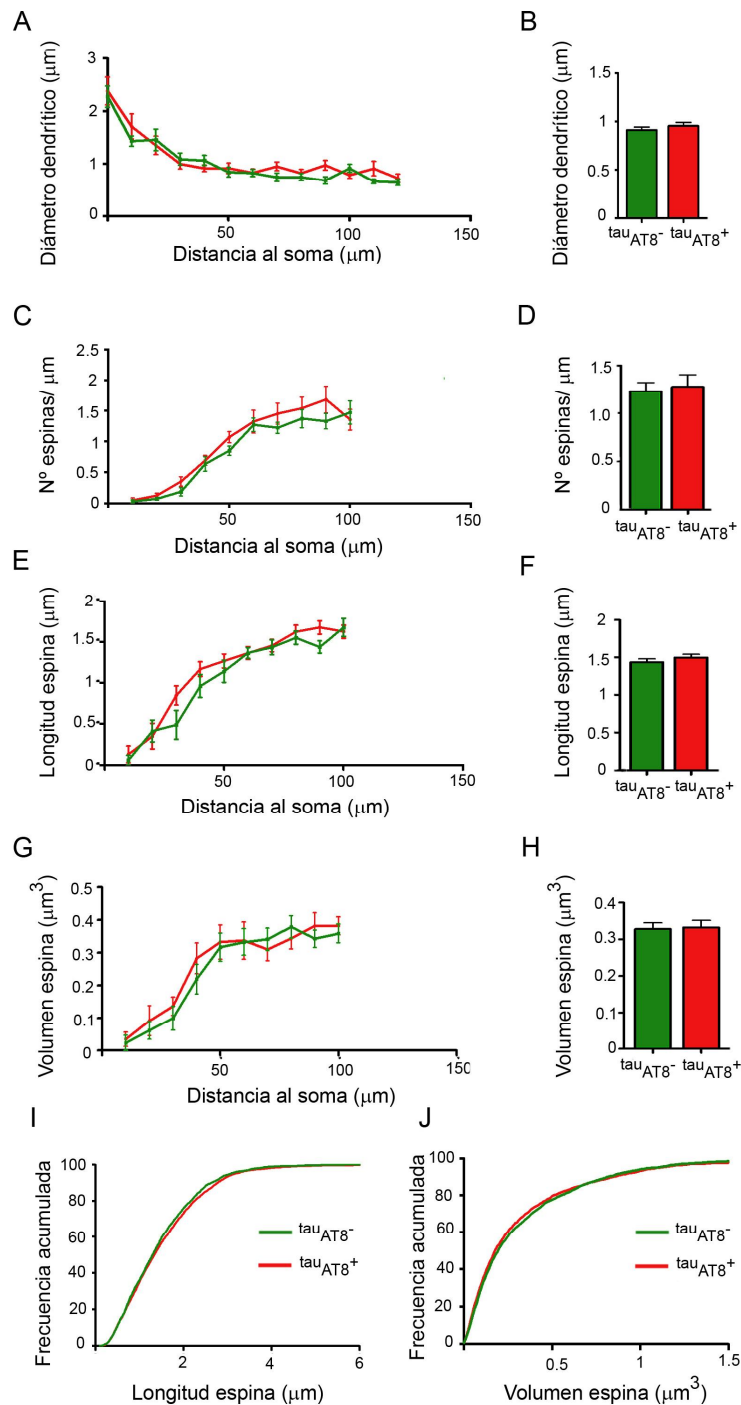
Comparamos el diámetro dendrítico entre las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> en función de la distancia al soma y no encontramos diferencias significativas ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 44A). Sin embargo,



**Figura 42.** Ejemplos de imágenes (proyecciones de 26-32 series de imágenes) obtenidas con microscopio confocal de dendritas basales de neuronas inyectadas con Lucifer yellow de (A-D y I-L) CPH y (E-H y M-O) CA1, pertenecientes a neuronas piramidales (A-H) PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> y (I-O) PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>. Barra de escala, 2  $\mu$ m.

cuando analizamos la media del diámetro dendrítico, encontramos que las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> ( $0,951 \pm 0,019 \mu$ m; n=10) presentaban un diámetro dendrítico significativamente menor que el de las

dendritas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> ( $1,222 \pm 0,097 \mu$ m; n=6; P=0,019, test *Mann-whitney*, Figura 44B). Presentaron una disminución del 22% en el diámetro dendrítico de las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>.



**Figura 43. Análisis morfométrico comparativo de dendritas de neuronas PHF- $\tau\text{au}_{\text{AT8}^+}$  ( $\tau\text{au}_{\text{AT8}^+}$ ) y PHF- $\tau\text{au}_{\text{AT8}^-}$  ( $\tau\text{au}_{\text{AT8}^-}$ ) en CPH. (A) Diámetro dendrítico en función de la distancia al soma y (B) media del diámetro dendrítico de cada dendrita. (C) Densidad de espinas (espinas/ $\mu\text{m}$ ) en función de la distancia al soma y (D) media de la densidad de cada dendrita. (E) Longitud de las espinas dendríticas en función de la distancia al soma y (F) media de cada dendrita. (G) Volumen de las espinas dendríticas en función de la distancia al soma y (H) media de cada dendrita. (I) Curvas de frecuencias acumuladas mostrando la distribución de la longitud y (J) el volumen de las espinas.**



### Densidad de espinas dendríticas

Analizamos la densidad de espinas en función de la distancia al soma y no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 44C). Tampoco cuando comparamos las medias de la densidad de cada dendrita (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>:  $1,637 \pm 0,141$  espinas/ $\mu\text{m}$ ,  $n=10$ ; PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>:  $1,881 \pm 0,189$  espinas/ $\mu\text{m}$   $n=6$ ) ( $P=0,427$ , test *Mann-whitney*, Figura 44D).

### Longitud de las espinas dendríticas

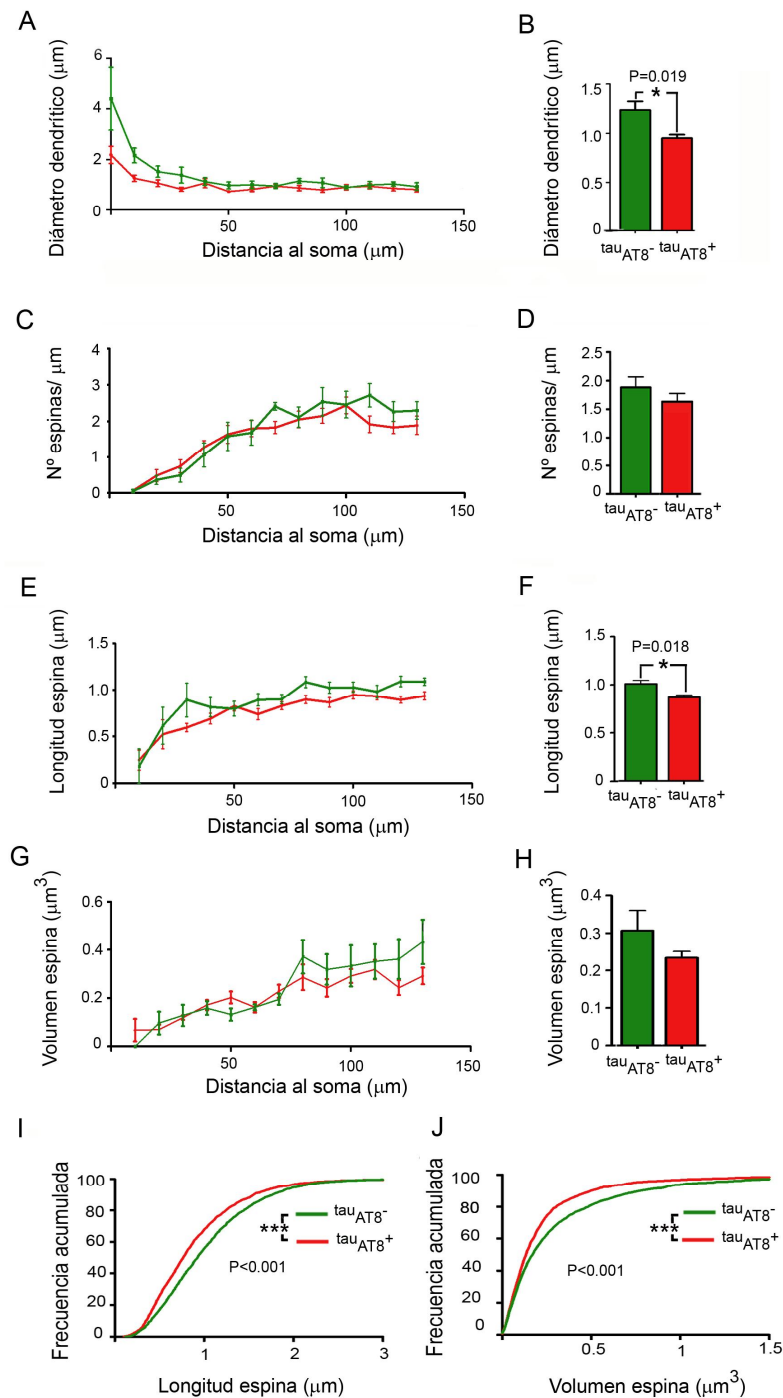
No presentaron diferencias significativas cuando analizamos la longitud de las espinas en función de la distancia al soma ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 44E). Sin embargo, cuando comparamos la media de la longitud de las espinas por dendrita entre las espinas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> encontramos diferencias significativas ( $P=0,018$ , test *Mann-whitney*, Figura 44F), siendo las espinas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> ( $0,864 \pm 0,025 \mu\text{m}$ ,  $n=10$ ) las que menor longitud presentaban ( $1,005 \pm 0,036 \mu\text{m}$ ,  $n=6$ ). Presentaron una disminución del 14% en la longitud de las espinas dendríticas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>. Del mismo modo, se observaron diferencias significativas cuando comparamos las frecuencias relativas acumuladas de la longitud de las espinas, con una menor frecuencia de espinas largas (PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>: 2756 espinas y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>: 2266 espinas,  $P < 0,001$ , test *Kolmogorov-Smirnov*, Figura 44I) en vez de una disminución general de la longitud de las espinas dendríticas. Por último, las espinas fueron subdivididas con respecto a su longitud en dos grupos arbitrarios: espinas cortas (longitud  $\leq 0,99 \mu\text{m}$ ) y espinas largas (longitud  $\geq 1 \mu\text{m}$ ). En las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> las espinas cortas representaron un 53,84% de las espinas totales, mientras

que en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> este valor fue 67,08%.

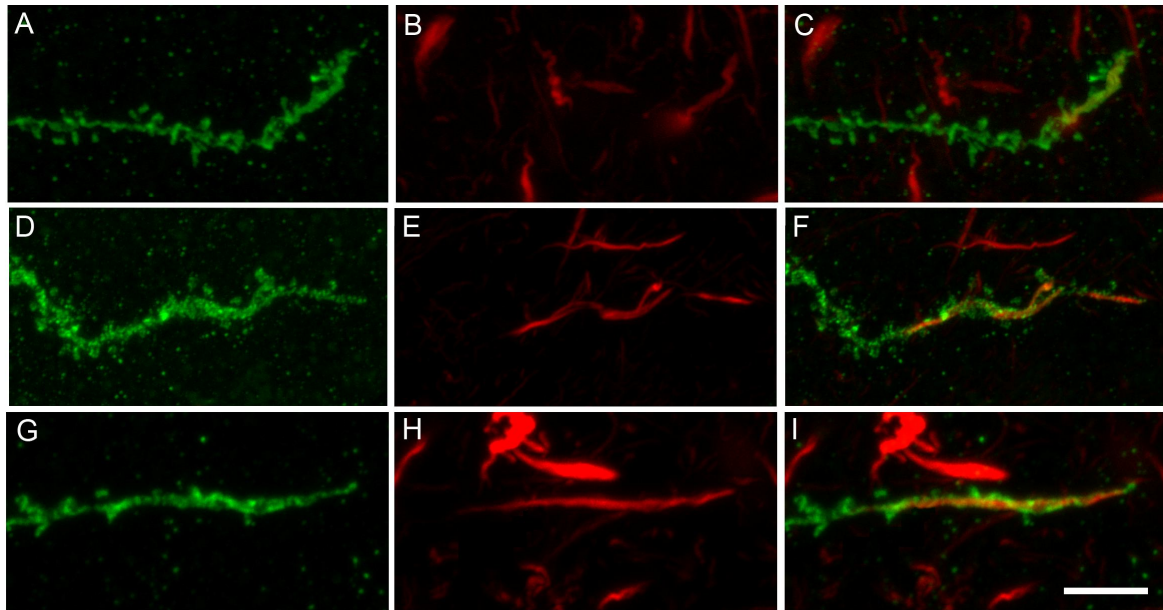
### Volumen de las espinas dendríticas

No se encontraron diferencias significativas cuando comparamos los volúmenes en función de la distancia al soma ( $P > 0,05$ , ANOVA de dos vías, test Bonferroni *post-hoc*, Figura 44G) ni cuando comparamos las medias de los volúmenes por dendrita entre las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> ( $0,234 \pm 0,017 \mu\text{m}^3$ ;  $n=10$ ) y las PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> ( $0,307 \pm 0,054 \mu\text{m}^3$ ;  $n=6$ ) ( $P=0,23$ , test *Mann-whitney*, Figura 44H). Sin embargo, cuando comparamos las frecuencias relativas acumuladas entre los dos grupos encontramos una menor frecuencia de espinas dendríticas grandes en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> ( $P < 0,001$ , test *Kolmogorov-Smirnov*, Figura 44J). Es decir, las espinas de mayor tamaño son las que reducen su volumen en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> y esta reducción representa una disminución del 24%. Por último, las espinas fueron subdivididas con respecto a su volumen en dos grupos arbitrarios: espinas pequeñas (volumen  $\leq 0,49 \mu\text{m}^3$ ) y espinas largas (volumen  $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$ ). En las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> las espinas pequeñas representaron un 80,71% de las espinas totales mientras que en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> este valor fue 85,27%.

En resumen, en la capa III de la CPH, todos los parámetros morfométricos estudiados en las dendritas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> permanecen inalterados cuando se comparan con dendritas de células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>. En CA1, también permanece sin alterarse la densidad de espinas en las dendritas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>. Sin embargo, cuando comparamos el diámetro dendrítico, encontramos que las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> presentan menor diámetro que



**Figura 44. Análisis morfométrico comparativo entre las dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> (tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>) y PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> (tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>) en CA1. (A) Diámetro dendrítico en función de la distancia al soma y (B) media del diámetro dendrítico de cada dendrita. (C) Densidad de espinas (espinas/μm) en función de la distancia al soma y (D) media de la densidad de cada dendrita. (E) Longitud de las espinas dendríticas en función de la distancia al soma y (F) media de cada dendrita. (G) Volumen de las espinas dendríticas en función de la distancia al soma y (H) comparando sus medias. (I) Curvas de frecuencias acumuladas mostrando la distribución de la longitud y (J) el volumen de las espinas. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .**



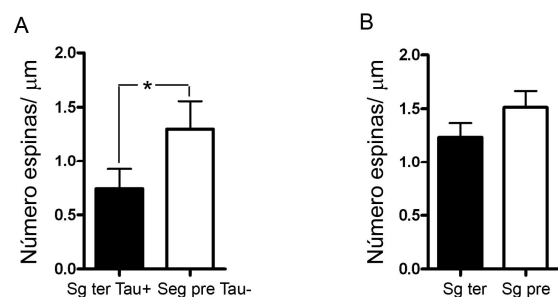
**Figura 45.** Imágenes obtenidas con microscopio confocal para mostrar la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en las dendritas distales de neuronas marcadas con PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma. Los paneles representan series de 18-21 imágenes. Nótese la disminución del número de espinas en las porciones de las dendritas marcadas con PHF-tau<sub>AT8</sub>. Barra de escala, 4  $\mu$ m.

las PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>. La morfología de las espinas también aparece alterada, puesto que encontramos que las espinas dendríticas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> presentan una menor longitud y frecuencia de espinas largas, y una menor frecuencia de espinas de tamaño grande que las espinas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>.

#### 4.2.3.4 Otras alteraciones morfológicas

Como ya se ha comentado, tanto en las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup> de CPH como de CA1, se encontraron acumulaciones de PHF-tau<sub>AT8</sub> (Figura 45) en las regiones distales de algunas dendritas (segmento terminal PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>). En estas regiones, la densidad de espinas parecía menor a simple vista, pero para cuantificar el posible efecto tóxico local de la proteína PHF-tau<sub>AT8</sub>, comparamos la densidad de espinas dendríticas de estos segmentos (10  $\mu$ m) con los segmentos de la misma longitud anteriores a ellos (segmento pre-terminal PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>). El estudio cuantitativo reveló que existe realmente una pérdida significativa de espinas

en los segmentos que expresan PHF-tau<sub>AT8</sub> (Figura 46A). Esta pérdida de espinas no existe cuando comparamos los segmentos finales (10  $\mu$ m) (segmento terminal) de dendritas que no expresan PHF-tau<sub>AT8</sub> con el segmento anterior de la misma longitud (segmento pre-terminal) (figura 46B). De toda la longitud dendrítica analizada en las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>ir, no



**Figura 46.** (A) Gráfico para ilustrar las diferencias entre la densidad de espinas en segmentos dendríticos finales (10  $\mu$ m), donde se acumula PHF-tau<sub>AT8</sub> (Sg ter Tau+) y segmentos de la misma longitud adyacente pre-terminal (Sg pre Tau-) de las mismas dendritas. (B) Muestra la comparación entre segmentos dendríticos finales (10  $\mu$ m) que no expresan PHF-tau<sub>AT8</sub> (Sg ter), con segmentos adyacentes pre-terminales de la misma longitud (Sg pre) de las mismas dendritas.

\* $P < 0,05$ .

encontramos ninguna acumulación de PHF-tau<sub>AT8</sub> que no fuera en estas partes distales o en las regiones proximales (dentro de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de distancia al soma). Es decir, la acumulación de PHF-tau<sub>AT8</sub> en las partes distales de las dendritas produce, en las zonas donde se acumula, una pérdida de espinas dendríticas, lo que

sugiere un efecto tóxico local. Además, nuestras observaciones indican que la aparición de PHF-tau<sub>AT8</sub> fibrilar en las dendritas no es progresiva desde el soma, sino que las dendritas distales parecen ser más susceptibles.



## **V. DISCUSIÓN**





## V DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de la presente tesis doctoral se pueden dividir en dos partes:

### I-Patología amiloide:

La presencia del péptido  $\beta$ -amiloide produce alteraciones locales en los segmentos de las dendritas que se encuentran en contacto con las placas. No obstante, debido a que las placas ocupan una fracción muy pequeña del volumen de las estructuras analizadas, la mayoría de las dendritas se localizan fuera del alcance de las placas. Por tanto, las alteraciones morfológicas encontradas en las dendritas fuera de las placas (disminución de la frecuencia de espinas de cabeza grande en GD y AL, aumento de la frecuencia de espinas de cabeza pequeña en el *stratum radiatum* y menor longitud de los cuellos en el *stratum oriens*) pueden estar implicadas de mayor forma en el deterioro cognitivo característico de la EA.

### II-Patología neurofibrilar:

La presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma neuronal de las células piramidales, no produce alteraciones morfológicas en las dendritas de la capa III de la CPH cuando las comparamos con neuronas que no presentan PHF-tau<sub>AT8</sub>, mientras que en CA1 las dendritas provenientes de neuronas que presentan PHF-tau<sub>AT8</sub> en el soma, aparecen con menor diámetro, menor longitud y frecuencia de espinas largas y menor frecuencia de espinas de volumen grande cuando las comparamos con neuronas que no presentan PHF-tau<sub>AT8</sub>. Por otro lado, la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> fibrilar en las dendritas induce una disminución significativa de espinas, pero la aparición de esta proteína en las dendritas no parece ser progresiva desde el soma, sino que los segmentos dendríticos distales y proximales parecen ser más susceptibles.

## 5.1 Neuropatología amiloide

### 5.1.1 Amígdala lateral

En primer lugar, los ratones transgénicos APP/PS1 muestran una respuesta alterada al test de miedo condicionado mediante estímulos auditivos (CMA) que depende de la AL (Koo *et al.*, 2004). En segundo lugar, el volumen ocupado por las placas A $\beta$  en AL es menor del 1%. De este modo es probable que las alteraciones cognitivas encontradas en este modelo APP/PS1 estén relacionadas con alteraciones que se producen fuera de las placas. Además, nuestros estudios cuantitativos sobre la densidad neuronal en la AL mostraron que no existe pérdida neuronal, por lo que las alteraciones encontradas con en el test CMA tampoco se deben a una pérdida neuronal. En tercer lugar, las neuronas que se encuentran fuera del alcance de las placas presentan una menor complejidad dendrítica y una menor frecuencia de espinas de cabeza grande. Por todos estos motivos se propone, que estos cambios pueden estar implicados en las alteraciones en el aprendizaje dependiente de la amígdala que ocurre en la EA.

Los pacientes de EA presentan alteraciones cognitivas relacionadas con el miedo condicionado (Hamann *et al.*, 2002), lo que implica que en estos pacientes la inhibición de la memoria no declarativa es común. Nuestros resultados representan una demostración adicional del deterioro cognitivo presentado por este modelo transgénico APP/PS1 que es semejante a la presentada por los pacientes con EA (Hsiao *et al.*, 1996). En este estudio, se muestra que las tareas dependientes de la amígdala están severamente dañadas en el modelo APP/PS1. Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados en otros laboratorios que indican que la sobreexpresión de APP en roedores conduce a elevados niveles

de A $\beta$  que modifican la respuesta al miedo condicionado mediante estímulos auditivos (Gerlai *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2007). Sin embargo, otros estudios en ratones APP/PS1 de edad comprendida entre 5-9 meses, muestran una reducción en la memoria condicionada al contexto, pero no en la memoria asociada a estímulos auditivos (Dineley *et al.*, 2002). La discrepancia con nuestros resultados puede deberse a que la combinación de los transgenes de APP y PS1 en los ratones utilizados sea diferente y que esta diferencia pueda afectar a la cantidad de A $\beta$  presente en el cerebro de los ratones APP/PS1. Además, en el estudio de Dineley *et al.* se utilizó distinta cepa (C57B6/C3 vs. C57B6/SJL), hecho que puede afectar a la respuesta al test CMA (Balogh *et al.*, 2003). La cepa SJL es más sensible al condicionamiento al miedo que la cepa C3, y esta sensibilidad podría facilitar el incremento en el comportamiento de inmovilidad observado por el grupo de Dineley (2002). Así mismo, las condiciones de entrenamiento establecidas en nuestro estudio (tres shocks de 0,75 mA con un intervalo de 30 segundos hasta el próximo shock) fueron distintas a las utilizados por Dineley (dos o cinco shocks de 0,5 mA con 5 o 40 segundos de intervalo entre la aparición del estímulo condicionado y el incondicionado). Estas diferencias experimentales son importantes ya que variaciones en la intensidad del shock, en el intervalo entre shocks y en el tiempo total de condicionamiento, están implicadas en el condicionamiento frente al estímulo contextual (Phillips *et al.*, 1992; Kaplan *et al.*, 1982; Rescorla *et al.*, 1972). De este modo, lo más probable es que las diferencias entre los resultados obtenidos por nosotros y los estudios de Dineley se deban a las diferentes condiciones biológicas y experimentales.

Hemos encontrado que, a diferencia de

los pacientes de EA (Herzog *et al.*, 1980), los ratones APP/PS1 no sufren pérdida neuronal en la AL. Esto nos lleva a pensar que es posible que la alteración al miedo condicionado sufrida por los pacientes de EA no sea debida a la pérdida neuronal. De hecho, la pérdida neuronal en la amígdala en los pacientes con EA aparece de forma tardía en el transcurso de la enfermedad por lo que la causa de la alteración en la memoria condicionada al miedo puede deberse a los cambios sinápticos ocurridos en estadios tempranos de la EA (Selkoe, 2002).

Distintas observaciones de nuestro estudio apoyan la hipótesis de que las placas A $\beta$  no son las responsables directas de las alteraciones detectadas con el test CMA en los ratones APP/PS1, sino que otras alteraciones deben ser las causantes del deterioro cognitivo:

- El volumen ocupado por las placas A $\beta$  en AL es menor del 1%, lo que implica que los cambios que ocurren dentro de las placas (disminución de la densidad dendrítica y del diámetro dendrítico) están restringidos a una fracción muy pequeña del neuropilo.
- La complejidad del árbol dendrítico de las neuronas fuera del alcance de las placas (neuronas NLP) es significativamente menor que en las neuronas controles (neuronas NTg-). Estas diferencias pueden tener un significado funcional importante ya que la complejidad del árbol dendrítico está relacionada con el grado de compartimentación de las entradas sinápticas y se ha propuesto que existe una relación directa entre el grado de complejidad y la capacidad de memoria y aprendizaje (Poirazi *et al.*, 2001). Por otra parte, aunque la densidad de espinas de las neuronas NLP es similar al de las neuronas controles, el hecho de que los árboles dendríticos de las neuronas NLP tengan una menor complejidad,

podría significar que existe una pérdida sináptica, lo que estaría de acuerdo con estudios previos que sugieren que en la EA las alteraciones cognitivas podrían deberse a alteraciones sinápticas, independientemente del número de placas (Terry, 2000; Masliah *et al.*, 2006).

Es decir, la reducida complejidad de las dendritas de las neuronas NLP en los ratones APP/PS1 puede contribuir a su limitada habilidad para aprender la respuesta condicionada al miedo. Sin embargo, no podemos descartar que otras alteraciones microanatómicas encontradas en este modelo pudieran ser las responsables directas o que también estén relacionadas con el deterioro cognitivo. Así, el estudio de la morfología de las espinas muestra que las espinas pertenecientes a dendritas que no están en contacto con las placas (espinas LP) presentan una disminución en la frecuencia de espinas de cabeza grande.

El volumen de la cabeza está relacionado con el tamaño de la densidad postsináptica (Harris *et al.*, 1989; Schikorski *et al.*, 1997; Arellano *et al.*, 2007a), con el número de vesículas presinápticas y con el número de vesículas adyacentes a la hendidura presináptica (Harris *et al.*, 1989). El área de densidad postsináptica es proporcional al número de receptores postsinápticos (Nusser *et al.*, 1998), mientras que el número de vesículas adyacentes a la hendidura presináptica es proporcional al conjunto de transmisores sinápticos listos para liberarse (Dobrunz, 1997). Además, el volumen de la cabeza es directamente proporcional a la intensidad de las corrientes sinápticas excitadoras que se generan en las espinas y por lo tanto es un buen parámetro morfométrico que refleja su actividad (Harris *et al.*, 1989; Schikorski *et al.*, 1997; Arellano *et al.*, 2007a; Nusser *et al.*, 1998; Dobrunz, 1997).

Por otra parte se sabe que las espinas grandes de la AL son elementos postsinápticos de las aferencias talámicas (Humeau *et al.*, 2005). Estas espinas expresan canales de calcio voltaje-dependientes tipo-R (CCVDs) que proporcionan la capacidad de modificar la fuerza sináptica (Humeau *et al.*, 2005) y confieren plasticidad sináptica duradera, requerida para la consolidación de la memoria en el condicionamiento al miedo (Schafe *et al.*, 2005). De este modo, una disminución en la frecuencia de espinas de cabeza grande podría contribuir a la pérdida de memoria en el condicionamiento al miedo observado en este modelo.

Se considera que las espinas grandes constituyen el sustrato físico para la memoria duradera (Kasai *et al.*, 2003; Bourne *et al.*, 2007) puesto que establecen sinapsis que son excepcionalmente estables después de la potenciación sináptica (Lang *et al.*, 2004; Bourne *et al.*, 2007). Estudios recientes han mostrado que las espinas grandes tienen una función importante en el tráfico de receptores asociados al aprendizaje y se ha sugerido que son críticas para la plasticidad sináptica (Matsuo *et al.*, 2008). Las espinas grandes poseen un elevado número de receptores AMPA (Matsuzaki *et al.*, 2001), los cuales se encuentran formando sinapsis muy estables (Matsuzaki *et al.*, 2001; Ashby *et al.*, 2006; Nimchinsky *et al.*, 2004) y son necesarios para la plasticidad sináptica (Lee *et al.*, 2003). Por lo que una disminución en la frecuencia de espinas de cabeza grande podría estar relacionada con las alteraciones en la plasticidad sináptica encontrada en el modelo APP/PS1 y estas alteraciones podrían estar afectando a la pérdida de capacidad para generar memoria asociada al miedo.

***Los cambios morfológicos que ocurren en el interior de las placas probablemente tienen poco efecto en el deterioro cognitivo***

Hemos observado que las dendritas que pasan por dentro de las placas son más delgadas y presentan una disminución en la densidad de espinas. Estas observaciones son concordantes con estudios previos realizados por otros autores que indican que las placas A $\beta$  están asociadas con alteraciones sinápticas locales y con un menor diámetro de las prolongaciones neuronales (Tsai *et al.*, 2004; Spires *et al.*, 2005). Puesto que existe una correlación relativamente débil entre la carga de placas y el grado de deterioro de la memoria en este modelo (Moechars *et al.*, 1996; Westerman *et al.*, 2002), la relevancia de los cambios morfológicos asociados a las placas en la patogénesis de EA no es clara y está siendo cuestionada por distintos investigadores (Haass *et al.*, 2007). Por todos estos motivos, se propone que los cambios morfológicos que suceden dentro de las placas pueden afectar localmente a los circuitos sinápticos. Pero debido a que las placas ocupan menos del 1% del volumen total de la AL, las alteraciones locales en los circuitos sinápticos relacionados con las placas están restringidos a una pequeña fracción del neuropilo. De este modo se sugiere que los cambios en la complejidad dendrítica y en la frecuencia de espinas grandes (cambios que no están directamente relacionados con las placas) contribuyen de forma notable a las alteraciones cognitivas encontradas en el modelo APP/PS1.

**5.1.2 Giro dentado**

En el presente estudio, se ha observado que las dendritas granulares del giro dentado que se encuentran en contacto con las placas A $\beta$  presentan alteraciones en la densidad de espinas. Por otra parte, se ha en-

contrado que las placas A $\beta$  ocupan un volumen muy pequeño (4%) con respecto al volumen total de la capa molecular del giro dentado, lo que hace pensar que el deterioro cognitivo encontrado en este modelo APP/PS1 puede estar producido por los cambios morfológicos que se producen fuera de las placas A $\beta$ .

***La disminución de la frecuencia de espinas de cabeza grande puede estar implicada en la pérdida de memoria***

La principal alteración morfológica encontrada en las dendritas localizadas en zonas sin placas es una disminución notable en la frecuencia de espinas de cabeza grande. Se sabe que las espinas dendríticas representan la mayor parte (90%) de los elementos postsinápticos excitadores en la corteza cerebral (Gray, 1959), que sufren cambios estructurales dependientes de actividad (Lang *et al.*, 2004; Knafo *et al.*, 2005) y que son la diana de los oligómeros de A $\beta$  (Battaglia *et al.*, 2007; Lacor *et al.*, 2007; Malm *et al.*, 2007). Además, se ha descrito en la corteza cerebral del ratón que las espinas con cabeza grande tienen las siguientes características:

- Pueden persistir durante meses (Grutzendler *et al.*, 2002; Ostroff *et al.*, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2002; Haber *et al.*, 2006; Witcher *et al.*, 2007).
- Contienen polirribosomas que regulan localmente la síntesis de proteínas y se encuentran rodeadas de prolongaciones astrogliales que regulan los niveles locales de glutamato y Ca<sup>++</sup> (Ostroff *et al.*, 2002; Haber *et al.*, 2006; Witcher *et al.*, 2007).
- Forman sinapsis excepcionalmente estables (Bourne *et al.*, 2007) ya que se encuentran enriquecidas con receptores AMPA (Matsuzaki *et al.*, 2001; Nimchinsky *et al.*, 2004; Ashby *et al.*, 2006).

- Existe una neoformación de espinas de cabeza grande tras la potenciación sináptica en el giro dentado (Bourne y Harris, 2007) y en la región CA1 (Lang *et al.*, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2001).

Por lo tanto, se ha propuesto que las espinas de cabeza grande están implicadas en la memoria a largo plazo (Kasai *et al.*, 2003; Bourne y Harris 2007). De hecho, se ha observado que las espinas de cabeza grande en el giro dentado forman sinapsis estables que forman parte del sistema de almacenamiento de memoria del hipocampo (Bontempi *et al.*, 1999), por lo que una disminución en su frecuencia podría estar implicada en la pérdida de memoria que aparece en este modelo (Malm *et al.*, 2007). Esta disminución en la frecuencia de espinas de cabeza grande puede ser debida a la pérdida de aferencias excitadoras que forman sinapsis con estas espinas, en vez de una alteración intrínseca de la propia espina (Fiala *et al.*, 2002). Tanto la memoria como la plasticidad sináptica se encuentran alteradas en modelos y pacientes de EA (Nalbantoglu *et al.*, 1997) probablemente debido a que no se lleva a cabo el agrandamiento relacionado con la plasticidad de las espinas dendríticas (Lang *et al.*, 2004).

### **La densidad de espinas se encuentra alterada por las placas A $\beta$**

En el presente trabajo se ha encontrado que las dendritas de la capa granular del giro dentado en el modelo APP/PS1 se encuentran afectadas localmente por las placas de A $\beta$ . Existe una disminución de la densidad de espinas en la porción de la dendrita que se encuentra dentro de la placa, mientras que la densidad de espinas aumenta en las dendritas que están tocando la placa. Sin embargo, la densidad de espinas se mantiene constante tanto en las dendri-

tas fuera del alcance de las placas (LP) como en las dendritas controles Tg-.

Nuestras observaciones coinciden con estudios previos en la neocorteza de ratón que también han descrito una disminución de espinas en las dendritas que pasan por las placas y un aumento de la densidad de espinas en la zona de la dendrita adyacente a la placa (Ferrer *et al.*, 1990a; Tsai *et al.*, 2004). Estas alteraciones se podrían explicar por cambios en la proporción de formación y eliminación de espinas que conduciría a una mayor proporción de dendritas sin espinas dentro de las placas, como se ha demostrado que ocurre en la neocorteza del modelo transgénico para EA Tg2576 (Spires-Jones *et al.*, 2007). Por otro lado, existen estudios que muestran una disminución de la densidad de espinas en el hipocampo de ratones APP antes y después de la aparición de las placas A $\beta$  (Jacobsen *et al.*, 2006). Esta discrepancia podría deberse a que en nuestros estudios y los realizados por Jacobsen *et al.* se han utilizado distintos modelos transgénicos (APP vs. APP/PS1), métodos de tinción (Método de Golgi vs. inyecciones intracelulares) y métodos de cuantificación (cuantificación en pequeños segmentos vs. longitud dendrítica completa). Otros estudios (Moolmam *et al.*, 2004), muestran una disminución en la densidad de espinas en ratones adultos APP/PS1, que podría ser explicada porque estos autores incluyeron en sus análisis los segmentos dendríticos que se encuentran atravesando las placas, los cuales presentan una disminución significativa de espinas (Tsai *et al.*, 2004). Otros estudios muestran una disminución en la densidad sináptica en modelos de EA (Dong *et al.*, 2007; Priller *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque nosotros cuantificamos las espinas dendríticas, la diferencia con estos estudios puede deberse a que estos autores cuantifi-

caron el número de sinapsis sin tener en cuenta su localización (espina o tallo dendrítico). Por lo que, la disminución de la densidad sináptica puede deberse a una disminución de sinapsis en el tallo dendrítico.

El incremento de la densidad de espinas en las zonas adyacentes a las placas podría explicarse por la liberación de factores neurotróficos por los astrocitos que se encuentran rodeando las placas (Mandybur, 1989; Saha *et al.*, 2006) y podría deberse a un mecanismo de compensación a la pérdida de espinas en las zonas de las dendritas que se encuentran dentro de la placa.

### ***Las placas A $\beta$ aparentemente no afectan a las espinas grandes***

La prevalencia de espinas grandes dentro de las placas fue similar a la encontrada en las dendritas de las neuronas en el ratón control Tg-. A pesar de que observamos una disminución del 36% en la densidad de espinas dentro de las placas, esta disminución se debió principalmente a una disminución en la frecuencia de espinas de cabeza pequeña (Figura 32C). Esto podría estar indicando que las placas actúan como un microambiente protector para las espinas grandes. De este modo, la presencia de espinas grandes dentro de las placas podría estar contribuyendo a la falta de correlación entre la presencia de placas y el deterioro cognitivo (Katzman *et al.*, 1988). La presencia de un mayor número de espinas en las regiones próximas a las placas podría explicar este fenómeno, debido a que estas dendritas poseen predominantemente espinas de cabeza pequeña. No obstante, aunque existan espinas en el interior de las placas y en su proximidad, no sabemos si se encuentran formando sinapsis o si éstas son funcionales.

En resumen, las alteraciones de las espinas dendríticas dentro de las placas, parecen

afectar de forma local a las conexiones sinápticas. No obstante, es difícil determinar cómo estos cambios contribuyen al deterioro cognitivo presentado en este modelo. Puesto que no existe una correlación entre la presencia de placas y el deterioro cognitivo presentados por los pacientes con EA (Terry *et al.*, 1991), es posible que la contribución de las placas al daño cognitivo sea relativamente pequeña. Todo esto sugiere que las alteraciones observadas en las regiones libres de placas, que representan aproximadamente el 95% del neuropilo, pueden tener una gran influencia en el estado cognitivo del modelo APP/PS1.

### **5.1.3 CA1**

El estudio de las alteraciones morfológicas en las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 muestra que dichas dendritas se encuentran afectadas por la presencia de placas A $\beta$ , dentro y fuera de ellas. Es importante destacar que algunas de las alteraciones morfológicas que suceden en CA1 no aparecen en otras áreas estudiadas con los mismos métodos, como son GD y AL. Por ejemplo, las espinas de las dendritas que se encuentran fuera del alcance de las placas en GD y AL, no presentan cambios en la longitud de los cuellos, alteración que sí encontramos en las dendritas del *stratum oriens*. A su vez, dentro de CA1 las espinas se encuentran alteradas de distinta forma dependiendo de su localización, debido a que en el *stratum radiatum* las espinas dendríticas se encuentran inalteradas con respecto a la longitud de los cuellos, a diferencia de lo que ocurre en el *stratum oriens*. Estas alteraciones específicas según su localización no pueden ser explicadas por la presencia de placas, ya que éstas se encuentran en la misma proporción en ambas capas (*stratum oriens* y *stratum radiatum*). Por



todo ello, concluimos que la patología relacionada con la EA tiene un efecto distinto en la microanatomía de las células principales dependiendo de la región cerebral.

Al igual que ocurre en GD y AL, observamos que los segmentos de las dendritas que se encuentran atravesando las placas tienen menor densidad de espinas cuando las comparamos con dendritas procedentes de ratones controles. Esta pérdida de espinas dentro de las placas puede estar afectando localmente los circuitos sinápticos. No obstante, debido a que las placas ocupan menos del 2% de volumen en CA1, los cambios morfológicos observados en las dendritas que se encuentran fuera del alcance de las placas, tienen una mayor probabilidad de contribuir a los daños cognitivos y sinápticos característicos de este modelo (Malm *et al.*, 2007). A su vez, encontramos que la densidad de espinas dendríticas se mantiene inalterada en las dendritas fuera del alcance de las placas como ocurre en GD y AL. Estos resultados indican que el daño cognitivo en este modelo (Malm *et al.*, 2007) no está propiciado por una pérdida de densidad de espinas en dendritas fuera del alcance de las placas. Al no estar alterada la densidad, es más probable que sean los cambios morfológicos de estas espinas las que puedan estar provocando el deterioro cognitivo.

Este estudio muestra que las espinas de las dendritas del *stratum oriens* tienen los cuellos significativamente más cortos. La morfología de los cuellos de las espinas dendríticas juega un papel muy importante en la compartimentación temporal del calcio y otros mensajeros secundarios (Yuste *et al.*, 2000). La reducción en el tamaño del cuello en el ratón APP/PS1 puede estar aumentando la difusión entre la espina y la dendrita. Espinas con una difusión más

rápida a lo largo del cuello podrían no ser capaces de retener segundos mensajeros o ser incapaces de activar ciertas proteínas tras la inducción de la potenciación duradera (LTP) (Bloodgood y Sabatini, 2005). Esta alteración en la plasticidad sináptica puede contribuir eventualmente al deterioro cognitivo presente en este modelo (Malm *et al.*, 2007).

El presente trabajo también muestra que los ratones APP/PS1 tenían mayor frecuencia de espinas de cabeza pequeña en el *stratum radiatum*. Las espinas de cabeza pequeña son más abundantes después de los procesos de depresión duradera (LTD), una forma de plasticidad sináptica que se encuentra aumentada en muchos modelos de EA (Shankar *et al.*, 2008). Como ya se ha comentado en el apartado 5.1.1 el tamaño de la cabeza está directamente relacionado con la difusión del calcio y esto se encuentra relacionado con la magnitud de las señales sinápticas transmitidas al tallo dendrítico (Harris y Stevens, 1989; Murthy *et al.*, 2000). Las espinas con las cabezas más pequeñas tienen densidades postsinápticas menores (Harris y Stevens, 1989) y contienen menos receptores AMPA cuando se comparan con espinas de tamaño de cabeza mayor (Kharazia y Weinberg, 1999), con lo cual tienen menor sensibilidad al glutamato (Matsuzaki *et al.*, 2001). Es posible que el incremento de la frecuencia de espinas de cabeza pequeña refleje una depresión sináptica a largo plazo, contribuyendo a las alteraciones cognitivas presentadas por este modelo. Por otra parte, la mayor frecuencia de espinas de cabeza pequeña, puede estar relacionada con la pérdida de LTP en este modelo (Trinchese *et al.*, 2004). Los cambios específicos según la capa observados en la longitud del cuello dendrítico y volumen de

la cabeza podrían tener una importante consecuencia funcional selectiva en los circuitos del hipocampo ya que las conexiones del *stratum oriens* y del *stratum radiatum* son diferentes (Amaral y Lavenex, 2004). En resumen, las espinas fuera del alcance de las placas de CA1 presentan cambios morfológicos importantes que podrían estar relacionados con las alteraciones funcionales de las sinapsis inducidas por la sobreexpresión de A $\beta$  en este modelo.

## 5.2 Neuropatología fibrilar

A continuación se detallan los principales hallazgos en cuanto al estudio de la histopatología de la proteína tau:

-Primero, en la capa III de la CPH, todos los parámetros morfológicos estudiados en las dendritas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> permanecen inalterados cuando se comparan con dendritas de células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>.

-Segundo, en CA1 también permanece sin alterar la densidad de espinas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup>, pero las dendritas presentan un menor diámetro que en las células piramidales de PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>.

-Tercero, las espinas dendríticas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> presentan una menor longitud y frecuencia de espinas largas y menor frecuencia de espinas de volumen grande que las espinas dendríticas de células PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>.

-Cuarto, la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> fibrilar en las dendritas induce una disminución significativa de espinas, pero la aparición de esta proteína en las dendritas no parece ser progresiva desde el soma, sino que los segmentos dendríticos distales y proximales parecen ser más susceptibles. Sin embargo, nuestros resultados no los podemos comparar ni verificar con otros trabajos ya que no existen estudios en los que se analice direc-

tamente las dendritas de neuronas que expresan PHF-tau, ni en tejido humano ni en tejido procedente de modelos animales.

## Enfermedad de Alzheimer; N=1

Las alteraciones morfológicas observadas en el cerebro humano patológico con respecto al cerebro normal son muy difíciles de interpretar, puesto que la variabilidad interindividual (sexo, edad, grado de patología, tratamiento médico, nivel educacional, etc.) es muy elevada y la incidencia de esta variabilidad en la estructura del cerebro podría ser interpretada como alteraciones en vez de diferencias interindividuales normales o debidas al tratamiento farmacológico. Es decir, cada caso de Alzheimer es único, lo que impide la extrapolación de los resultados obtenidos en un caso a toda la población de pacientes con esta patología. No obstante, una de las ventajas del presente estudio es que hemos utilizado como neuronas control, neuronas del mismo paciente que no se encuentran afectadas por la patología neurofibrilar y que se localizan en las mismas áreas de estudio que las que presentan patología neurofibrilar. De este modo, podemos estar seguros de que los cambios observados se deben a la patología neurofibrilar y no a otros posibles factores.

## Ausencia de efecto de la patología amiloide en las neuronas analizadas

Estudios previos realizados en diversos laboratorios, incluyendo el nuestro (Tsai *et al.*, 2004; Spires *et al.*, 2005; Knafo *et al.*, 2008, Knafo *et al.*, 2009, Merino-Serrais *et al.*, 2010), indican que las dendritas que están en contacto con las placas sufren una serie de alteraciones (por ejemplo, disminución de la densidad de espinas y cambios en el tamaño y longitud de las espinas dendríticas). Por estos motivos, en nuestro análisis se han eliminado aquellas dendritas que se

encontraban en contacto con las placas. Sin embargo, hemos observado en el modelo APP/PS1 que las dendritas que no se encuentran en contacto con las placas también presentan alteraciones morfológicas (disminución de frecuencia de espinas de cabeza grande en el giro dentado y en la amígdala lateral, aumento de frecuencia de espinas de cabeza pequeña en el *stratum radiatum* y menor longitud de los cuellos de las espinas dendríticas en el *stratum oriens*) probablemente debido al efecto de oligómeros de A $\beta$ . Estas observaciones sugieren que los cambios encontrados en las espinas dendríticas del paciente analizado en el presente estudio pudieran deberse a la presencia de estos oligómeros. De hecho, estas moléculas pueden activar GSK3 (Townsend *et al.*, 2007; Magdesian *et al.*, 2008) que es la quinasa que induce la fosforiación de tau en el sitio AT8 (Hanger *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio utilizamos como neuronas control aquellas que no presentan PHF-tau<sub>AT8</sub> en la misma región del mismo individuo, por lo que el posible efecto tóxico de los oligómeros de A $\beta$  puede afectar de igual forma a todas las espinas dendríticas de nuestro estudio.

### **Distinto grado de patología neurofibrilar: CPH y CA1**

Existen estudios que muestran que el marcaje con el anticuerpo PHF-tau<sub>AT8</sub> se observa principalmente en neuronas de pacientes con un estadio temprano de la EA, mientras que el epítipo PHF-1 se observa con mayor frecuencia en estadios tardíos de la EA (Kimura *et al.*, 1996; Augustinack *et al.*, 2002; Maurage *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2003). Nosotros observamos que el porcentaje de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir era diferente en CPH y CA1, lo que indica que estas dos regiones se en-

cuentran afectadas en distinto grado por la patología neurofibrilar. Así, hemos observado que en CPH los porcentajes de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir y PHF-tau<sub>PHF1</sub>-ir con respecto al número total de neuronas fue 11% y 2,5%, respectivamente, mientras que en CA1, estos porcentajes fueron 40% y 28%, respectivamente. Por tanto, nuestros resultados parecen indicar que CPH se encuentra en un estadio más temprano de la patología neurofibrilar, mientras que CA1 presenta un estadio más avanzado.

### **Alteraciones de las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub>-ir**

Los resultados indican que las espinas de las dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> de la región de CA1 (patrón IIb y IIc) se encuentran alteradas morfológicamente, mientras que espinas de las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> de la capa III de la CPH (patrón I y IIa) no presentan alteraciones significativas:

#### **Diámetro dendrítico**

Hemos observado que en CA1, el diámetro dendrítico de las dendritas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> con patrón IIb o IIc se encuentra disminuido en un 22% cuando lo comparamos con el diámetro dendrítico de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>. Esto implica que existe una reducción del citoplasma y probablemente de los orgánulos que típicamente se encuentran en las dendritas, como neurofilamentos, microtúbulos, mitocondrias y retículo endoplasmático (Peters *et al.*, 1991). Estos orgánulos están implicados en procesos metabólicos esenciales y aunque desconocemos si esta reducción afecta de forma selectiva a ciertos orgánulos o si simplemente existe una reducción en el citosol, es probable que las modificaciones en el diámetro dendrítico afecten al funcionamiento metabólico de la neurona. Además, desde el

punto de vista electrofisiológico, el diámetro dendrítico está estrechamente relacionado con la conductancia eléctrica (Holmes 1989; Mainen y Sejnowski, 1996; Vetter *et al.*, 2001), por lo que la disminución del diámetro dendrítico observado en nuestro estudio probablemente resulte también en una alteración funcional.

#### Densidad de espinas dendríticas

En el presente estudio hemos observado que las dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> de la capa III de la CPH y de la capa piramidal de CA1, no presentan alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas cuando las comparamos con dendritas de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>-</sup>. Por otra parte, observamos en ambas regiones que el PHF-tau<sub>AT8</sub> se acumula en los segmentos distales de ciertas dendritas. Estos segmentos mostraron una disminución en la densidad de espinas cuando los comparamos con los segmentos dendríticos inmediatamente anteriores. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el PHF-tau<sub>AT8</sub> fibrilar tiene un efecto tóxico local, afectando solo a la zona donde se acumula, es decir, no de forma homogénea a toda la dendrita.

#### Morfología de las espinas dendríticas

En el caso de las espinas dendríticas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> de la CPH no encontramos ninguna alteración. Es decir, tanto la longitud como el volumen de las espinas dendríticas no mostraron cambios significativos. Sin embargo, sí observamos cambios significativos en las espinas dendríticas de las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> en CA1. Estos cambios consistían en una disminución de la longitud de las espinas en general, así como una menor frecuencia de espinas largas y de espinas grandes. El hecho de que existan cambios en las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> en CA1 pero no en las de CPH podría explicar-

se por el grado de afectación de las neuronas inyectadas; en CA1 las neuronas mostraban patrones IIb o IIc (estadios avanzados), mientras que en CPH mostraban patrones I o IIa (estadios iniciales). Aunque el número de neuronas inyectadas PHF-tau<sub>AT8</sub><sup>+</sup> fue relativamente pequeño, es importante recordar que según nuestros datos cuantitativos indicados más arriba, un porcentaje elevado de las neuronas en CA1 mostraban patología neurofibrilar avanzada mientras que en la CPH este porcentaje era relativamente bajo. Es decir, es muy probable que la población de neuronas que hemos inyectado al azar represente a la población general de neuronas que se encuentran en estas dos regiones corticales cuya afectación es claramente distinta (*vid.* § Figuras 38 y 39).

#### **Possible significado funcional de las alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas**

Los cambios observados en la morfología de las espinas en las neuronas de CA1 probablemente tienen una consecuencia funcional importante. En primer lugar, se ha observado que cambios en la longitud de los cuellos de las espinas dendríticas da lugar a cambios en la compartimentación temporal del calcio y de otros mensajeros secundarios y estas modificaciones pueden afectar a la inducción de LTP (Yuste *et al.*, 2000; Bloodgood y Sabatini, 2005). En segundo lugar, el volumen de la cabeza de la espina dendrítica está relacionado con el tamaño de la densidad postsináptica (Harris *et al.*, 1989; Schikorski *et al.*, 1997; Arellano *et al.*, 2007a), con el número de vesículas presinápticas y con el número de vesículas adyacentes a la hendidura presináptica (Harris *et al.*, 1989). El área de densidad postsináptica es proporcional al número de

receptores postsinápticos (Nusser *et al.*, 1998), mientras que el número de vesículas adyacentes a la hendidura presináptica es proporcional al conjunto de transmisores sinápticos listos para liberarse (Dobrunz y Stevens, 1997). Además, el volumen de la cabeza es directamente proporcional a la fuerza de las corrientes sinápticas y es un buen parámetro morfométrico de su actividad (Harris *et al.*, 1989; Schikorski *et al.*, 1997; Arellano *et al.*, 2007a; Nusser *et al.*, 1998; Dobrunz y Stevens, 1997).

### **PHF-tau: neuroprotección vs. efecto tóxico**

Actualmente existe gran controversia sobre el papel del PHF-tau. Por un lado, se piensa que las formas de PHF-tau soluble tienen un efecto tóxico debido a que secuestran a la proteína tau normal y otras MAPs produciendo un desensamblaje de los microtúbulos que compromete al transporte axónico, pudiendo producirse una pérdida de sinapsis (Iqbal *et al.*, 2005). Así, se ha propuesto como mecanismo neuroprotector que la proteína PHF-tau soluble se asociaría entre si formando los NF, retirando del citosol el PHF-tau soluble (Andorfer *et al.*, 2003; Santacruz *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Spires-Jones *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores proponen que los NF tienen un efecto tóxico ya que están asociados con alteraciones en el transporte axónico que culminan en muerte celular (Stamer *et al.*, 2002; Terwel *et al.*, 2002; Cente *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007). En concordancia con esta hipótesis existen estudios que sugieren una alta correlación entre pérdida de marcadores sinápticos y presencia de NF (Honer *et al.*, 1992; Masliah *et al.*, 1992; Wakabayashi *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 1996; Samuel *et al.*, 1997; Heffernan *et al.*, 1998).

El presente trabajo muestra que la presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> en estadios tardíos

produce alteraciones en las espinas dendríticas pero no en los estadios iniciales, es decir antes de que formen NF (patrón I) o cuando estos empiezan a aparecer (patrón IIa). De este modo, las neuronas que expresan PHF-tau<sub>AT8</sub> con patrones I o IIa podrían encontrarse en un estadio patológico reversible. De hecho, los estudios de Arendt *et al.* (2003) sobre los cambios reversibles en la fosforilación de la molécula tau en animales que hibernan son especialmente relevantes en este contexto. Estos autores encontraron que las ardillas durante el estado de hibernación muestran una inducción en la fosforilación de la molécula tau tipo PHF en el cerebro, similar a la que sucede en la EA (Avila *et al.*, 2004). Arendt demostró que cambios en la innervación/desinnervación de las neuronas piramidales de CA3 por las fibras musgosas durante la hibernación/vigilia (Popov y Bocharova, 1992) estaban asociados con la fosforilación de PHF-tau. Así, propusieron que la formación y degradación de PHF-tau puede representar un mecanismo fisiológico no necesariamente asociado con efectos patológicos, sino con fenómenos de plasticidad neuronal normal.

En el caso de las neuronas con una patología más avanzada, es decir, neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub> con patrones IIb o IIc, lo sorprendente fue observar que existe una pérdida de espinas dendríticas solamente en ciertos segmentos dendríticos distales. Si asumimos que la gran mayoría de las espinas dendríticas establecen contactos sinápticos (Arellano *et al.*, 2007b), nuestras observaciones indicarían que estas neuronas están desconectadas en las partes distales, pero no en el resto del árbol dendrítico que constituye la mayor parte de la arborización dendrítica. Sin embargo, no podemos descartar que existan alteraciones fisiológicas o moleculares a nivel de la transmisión sináptica. De hecho,

las espinas dendríticas de estas neuronas muestran cambios significativos de su morfología (tamaño y longitud de las espinas) y, como hemos visto más arriba, estos cambios tienen importantes consecuencias funcionales.

Por último, observamos que algunas neuronas inyectadas intracelularmente que presentaban un patrón IIc muy desarrollado mostraban un árbol dendrítico muy reducido. Aunque esto pudiera deberse a que las inyecciones no funcionaron correctamente en estas neuronas, es posible que puedan encontrarse en un estadio de atrofia más avanzado. Es decir, si asumimos la hipótesis ampliamente aceptada de que la degeneración o atrofia neuronal es progresiva, según nuestras observaciones, ésta comenzaría con una desconexión sináptica desde las regiones más distales de las dendritas hacia las más proximales. Esta desconexión progresiva hacia el soma debe ser analizada con más detalle por su implicación funcional ya que existe una segregación espacial de las conexiones sinápticas según el tipo de información que llevan a cabo. Por ejemplo, las conexiones sinápticas de los axones originados dentro de la misma columna cortical inervan preferentemente a las dendritas basales proximales de las células piramidales (Markram *et al.*, 1997; Feldmeyer *et al.*, 2002). Así mismo, la inervación catecolaminérgica difiere a lo largo del árbol dendrítico basal (Benavides-Piccione *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que los segmentos proximales y distales de las dendritas basales presentan características diferentes con respecto a la plasticidad e integración sináptica (Markram *et al.*, 1997; Hausser y Mel, 2003; Gordon *et al.*, 2006; Gelfo *et al.*, 2009). Todo esto sugiere que a medida que se produce esta desconexión celulípeta, las consecuencias funcionales deben ser selectivas y

progresivas, al menos a nivel celular.

En conclusión, la presencia de neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub> en el cerebro humano no necesariamente tiene que tener consecuencias graves e irreversibles, sino que el deterioro cognitivo típico de la EA probablemente dependa, entre otros factores, del número relativo de neuronas que presentan patrones IIb y IIc. Esperamos que en un futuro próximo podamos verificar las observaciones e hipótesis enunciadas en el presente trabajo mediante el estudio detallado de la correlación entre el deterioro cognitivo y el análisis microanatómico de las neuronas PHF-tau en otros pacientes con EA, así como mediante la utilización de modelos animales adecuados.

### 5.3 Deterioro cognitivo en pacientes con enfermedad de Alzheimer: $\beta$ -amiloide vs. PHF-tau

Es evidente que la patología amiloide y neurofibrilar tienen un impacto variable en los distintos circuitos corticales y que estas alteraciones no son homogéneas ni entre pacientes ni entre distintas capas y áreas corticales de un mismo paciente (Terry y Katzman, 1983; Kemper, 1984; Pearson *et al.*, 1985; Rogers y Morrison, 1985; Duyckaerts *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1987; Rafalowska *et al.*, 1988; Hof y Morrison, 1990; Hof *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 1991; Lippa *et al.*, 1992; Gomez-Isla *et al.*, 1996; Kuljis y Tikoo, 1997; Thal *et al.*, 2000; Morrison y Hof, 2007; Garcia-Marin *et al.*, 2009; Blazquez-Llorca *et al.*, 2010; Blazquez-Llorca *et al.*, 2011). Todo esto indica que las alteraciones son complejas y afectan a una gran variedad de circuitos corticales. Por otra parte, se considera que los cambios en los circuitos neuronales que se encuentran en el cerebro de un individuo con una determinada enfermedad están relacionados directamente

con la inducción o mantenimiento de la actividad anómala característica de dicha enfermedad, cuando en realidad podrían representar consecuencias de la misma o incluso mecanismos compensatorios de protección. Es decir, cualquier lesión cortical obviamente da lugar a una alteración de los circuitos neuronales, pero solamente algunos de estos cambios pueden inducir o favorecer la enfermedad, mientras que otros están relacionados con un proceso compensatorio o, simplemente, inducen una alteración del procesamiento de información que no tiene ninguna consecuencia relacionada con la enfermedad. Por estos motivos, existe un intenso debate sobre las causas y los mecanismos celulares mediante los cuales la patología amiloide y neurofibrilar conducen a un deterioro cognitivo progresivo y demencia. De hecho, se publican cientos de artículos anualmente sobre la EA pero los

avances en este campo son relativamente modestos, no solamente porque es un tema complejo y difícil de analizar en seres humanos por la falta de datos sobre circuitos neuronales, sino porque se deberían tener en cuenta factores que muchas veces no se conocen y que, además, muestran una gran variabilidad, tales como la duración de la enfermedad, localización y grado del daño neuronal, presencia de otras patologías cerebrales, características psiquiátricas y psicológicas, etc. Por ello, para avanzar eficazmente en el conocimiento de la EA es fundamental realizar estudios correlativos clínico-estructurales detallados en los que se analice conjuntamente la microorganización del cerebro a nivel morfológico y molecular junto con las características clínicas de los pacientes.





## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

### 1. PATOLOGÍA AMILOIDE: modelo transgénico APP/PS1.

#### Amígdala lateral (AL):

- 1a. Los ratones transgénicos APP/PS1 muestran una respuesta alterada al test de miedo condicionado mediante estímulos auditivos (CMA) que depende de la AL.
- 1b. El volumen ocupado por las placas A $\beta$  en AL es menor del 1%. Por lo que, es probable que las alteraciones cognitivas encontradas en el modelo APP/PS1 estén relacionadas con alteraciones que se produzcan fuera de las placas. Además, nuestros estudios cuantitativos sobre la densidad neuronal en la AL mostraron que no existe pérdida neuronal, por lo que las alteraciones encontradas en el test CMA tampoco se deben a una pérdida neuronal.
- 1c. Las neuronas que se encuentran fuera del alcance de las placas presentan una menor complejidad dendrítica y una menor frecuencia de espinas de cabeza grande. Nosotros proponemos que estos cambios pueden estar implicados en las alteraciones en el aprendizaje dependiente de la AL que ocurre en la EA.

#### Formación del hipocampo (giro dentado, GD; y CA1):

- 1d. El volumen ocupado por las placas con respecto al volumen total del GD y de CA1 es relativamente pequeño (aproximadamente 4 % en el GD y 1% en CA1). Por lo tanto, las alteraciones morfológicas encontradas en las dendritas que están en contacto con placas no parecen ser la principal causa del deterioro cognitivo descrito en este modelo.
- 1e. Las dendritas de las neuronas que se encuentran fuera del alcance de las placas presentan una serie de cambios significativos que consisten en una disminución en la frecuencia de espinas de cabeza grande en GD, un aumento de espinas de cabeza pequeña en el *stratum radiatum* de CA1, así como una disminución en la longitud de los cuellos en el *stratum oriens* de CA1. Puesto que estas dendritas representan la mayoría de las dendritas, estas alteraciones podrían representar el sustrato microanatómico de las alteraciones cognitivas en este modelo.

### 2. PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR: paciente con enfermedad de Alzheimer.

#### Corteza parahipocampal (CPH) e hipocampo (CA1):

- 2a. Las neuronas PHF-tau<sub>AT8</sub> representan un 10% y un 40% de todas las neuronas en la CPH y en CA1, respectivamente. Mientras que el porcentaje de neuronas inmunoreactivas para PHF-tau<sub>PHF1</sub> en la CPH es 2,5% y en CA1 27,5%. Estos resultados indican que la patología neurofibrilar se encuentra más avanzada en CA1 que en la CPH.
- 2b. En la capa III de la CPH, todos los parámetros morfológicos estudiados en las dendritas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8+</sub> permanecen inalterados cuando se comparan con dendritas de células piramidales PHF-tau<sub>AT8-</sub>.
- 2c. En CA1, también permanece sin alterar la densidad de espinas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8+</sub>, pero las dendritas presentan un menor diámetro que en las células piramidales de PHF-tau<sub>AT8-</sub>. Además, las espinas dendríticas de las células piramidales PHF-tau<sub>AT8+</sub> presentan una menor longitud y frecuencia de espinas largas y menor frecuencia de espinas de volumen grande que las espinas dendríticas de células PHF-tau<sub>AT8-</sub>.
- 2d. La presencia de PHF-tau<sub>AT8</sub> fibrilar en las dendritas induce una disminución local de espinas, pero la aparición de esta proteína en las dendritas no parece ser progresiva desde el soma, sino que las dendritas distales y proximales parecen ser más susceptibles.
- 2e. El deterioro cognitivo típico de la EA parece depender del número relativo de neuronas que presentan patrones de tinción característico de los estadios finales de la patología neurofibrilar (patrones IIb y IIc).



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Green-gard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK. 2005. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20(2):187-198.
- Alonso Adel C, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2006. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23):8864-8869.
- Alonso-Nanclares L, Minelli A, Melone M, Edwards RH, Defelipe J, Conti F. 2004. Perisomatic glutamatergic axon terminals: a novel feature of cortical synaptology revealed by vesicular glutamate transporter 1 immunostaining. *Neuroscience* 123(2):547-556.
- Alpar A, Ueberham U, Bruckner MK, Seeger G, Arendt T, Gartner U. 2006. Different dendrite and dendritic spine alterations in basal and apical arbors in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* 1099(1):189-198.
- Alvarez P, Zola-Morgan S, Squire LR. 1995. Damage limited to the hippocampal region produces long-lasting memory impairment in monkeys. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):3796-3807.
- Alzheimer A. 1907. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Allgemeine Seitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. 64:146-148.
- Alzheimer A. 1911. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z gesamte Neurol Psychiatr* 4:356-385.
- Amaral DG, Insausti R. 1990. Hippocampal formation. En: Paxinos G, Mai, JK (eds). *The Human Nervous System*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. p: 711-755.
- Amaral DG, Lavenex P. 2004. Hippocampal Neuroanatomy. En: Andersen, P, Morris, R, Amaral, D, Bliss T, O'Keefe, J (eds). *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press. p 37-110.
- Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve PE. 1966. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol Scand* 66(4):448-460.
- Andersen P, Morris R, Amaral DG, Bliss TV, O'keefe. 2007. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P. 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* 86(3):582-590.
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. 2007a. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci* 1(1):131-143.
- Arellano JI, Espinosa A, Fairen A, Yuste R, DeFelipe J. 2007b. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 145(2):464-469.
- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W. 2003. Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 23(18):6972-6981.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. 1991. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1(1):103-116.
- Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. 1992. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42(9):1681-1688.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barriónuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9(7):557-568.
- Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM. 2006. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* 26(26):7046-7055.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103(1):26-35.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2):361-384.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8(9):663-672.
- Balogh SA, Wehner JM. 2003. Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav Brain Res* 140(1-2):97-106.
- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM. 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477(1-2):90-99.
- Battaglia F, Wang HY, Ghilardi MF, Gashi E, Quartarone A, Friedman E, Nixon RA. 2007. Cortical plasticity in Alzheimer's disease in humans and rodents. *Biol Psychiatry* 62(12):1405-1412.
- Benavides-Piccione R, Arellano JI, DeFelipe J. 2005. Catecholaminergic innervation of pyramidal neurons in the human temporal cortex. *Cereb Cortex*

- 15(10):1584-1591.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39(1):17-23.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. 2005. Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45(5):675-688.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. 2001. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8(5):229-242.
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Defelipe J. 2010. Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Front Neuroanat* 4:20.
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Merino-Serrais P, Avila J, Defelipe J. Abnormal phosphorylation of tau in thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in Alzheimer's disease. (enviado).
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* 368(9533):387-403.
- Bloodgood BL, Sabatini BL. 2005. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science* 310(5749):866-869.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400(6745):671-675.
- Bourne J, Harris KM. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17(3):381-386.
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. 1994. A sequence of cytoskeletal changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87(6):554-567.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-259.
- Brodmann K. 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth.
- Butterfield DA. 2002. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* 36(12):1307-1313.
- Cajal SR. 1888. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Hist Norm Pat* 1:1-10.
- Cajal SR. 1892. El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Rev Ciencias Méd*, 18: 457-476.
- Cajal SR. 1893. Estructura del asta de Ammon. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural* 22:53-114.
- Cajal SR. 1896. Las espinas colaterales de las células del cerebro teñidas por el azul de metileno. *Rev. Trim. Micrográf. Madrid*. 1, 123-136.
- Cajal SR. 1899-1904. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Madrid: Moya.
- Cajal SR. 1911. Histologie de système nerveux de l'Homme et des vertébrés. Tome II. Paris, Maloine.
- Cajal SR. 1933. ¿Neuronismo o reticularismo? Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las células nerviosas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal. IX, Madrid.
- Campbell AW. 1905. Histological studies on the localisation of cerebral function Cambridge: Cambridge University Press.
- Capetillo-Zarate E, Staufenbiel M, Abramowski D, Haass C, Escher A, Stadelmann C, Yamaguchi H, Wiestler OD, Thal DR. 2006. Selective vulnerability of different types of commissural neurons for amyloid beta-protein-induced neurodegeneration in APP23 mice correlates with dendritic tree morphology. *Brain* 129(Pt 11):2992-3005.
- Cente M, Filipcik P, Pevalova M, Novak M. 2006. Expression of a truncated tau protein induces oxidative stress in a rodent model of tauopathy. *Eur J Neurosci* 24(4):1085-1090.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2(3):271-276.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. 1990. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 302(2):206-219.
- Clarke J, Thornell A, Corbett D, Soininen H, Hiltunen M, Jolkonen J. 2007. Overexpression of APP provides neuroprotection in the absence of functional benefit following middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Neurosci* 26(7):1845-1852.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8(1):79-84.
- Colella R. 1892. Sulle fine alterazioni della corteccia cerebrale in alcune malattie mentali. *Gazz. Med. Pavia* 1, 128-131.
- Coppede F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. 2006. Genes and the environment in neurodegeneration. *Biosci Rep* 26(5):341-367.
- Cruts M, Van Broeckhoven C. 1998. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11(3):183-190.
- Crystal H, Dickson D, Fuld P, Masur D, Scott R, Mehler M, Masdeu J, Kawas C, Aronson M, Wolfson L. 1988. Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 38(11):1682-1687.

- DeFelipe J. 1993. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3(4):273-289.
- DeFelipe J. 2002. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136:215-238.
- DeFelipe J. 2009. *Cajal's Butterflies of the Soul: Science and Art*. New York: Oxford University Press.
- DeFelipe J, Farinas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39(6):563-607.
- DeFelipe J, Fernandez-Gil MA, Kastanauskaite A, Bote RP, Presmanes YG, Ruiz MT. 2007. Macroanatomy and microanatomy of the temporal lobe. *Semin Ultrasound CT MR* 28(6):404-415.
- DeFelipe J, Huntley GW, del Rio MR, Sola RG, Morrison JH. 1994. Microzonal decreases in the immunostaining for non-NMDA ionotropic excitatory amino acid receptor subunits GluR 2/3 and GluR 5/6/7 in the human epileptogenic neocortex. *Brain Res* 657(1-2):150-158.
- Deshpande A, Kawai H, Metherrate R, Glabe CG, Busciglio J. 2009. A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci* 29(13):4004-4015.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* 16(3):285-298; discussion 298-304.
- Dineley KT, Xia X, Bui D, Sweatt JD, Zheng H. 2002. Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem* 277(25):22768-22780.
- Dobrunz LE, Stevens CF. 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18(6):995-1008.
- Dong H, Martin MV, Chambers S, Csernansky JG. 2007. Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *J Comp Neurol* 500(2):311-321.
- Duvernoy HM. 2005. *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. Berlin.
- Duyckaerts C, Hauw JJ, Bastenaire F, Piette F, Poulain C, Rainsard V, Javoy-Agid F, Berthaux P. 1986. Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 70(3-4):249-256.
- Elston GN, DeFelipe J. 2002. Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Prog Brain Res* 136:109-133.
- Faber ES, Callister RJ, Sah P. 2001. Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. *J Neurophysiol* 85(2):714-723.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278(16):1349-1356.
- Feldman ML. 1984. Morphology of the neocortical pyramidal neuron. En: Peters A y Jones EC (eds). *Cerebral cortex, vol1 Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum. p 123-200.
- Feldmeyer D, Lubke J, Silver RA, Sakmann B. 2002. Synaptic connections between layer 4 spiny neuron-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of inter-laminar signalling within a cortical column. *J Physiol* 538(Pt 3):803-822.
- Fernandez-Espejo E. 1996. Basic neurobiology of hippocampal formation. *Rev Neurol* 24(131):779-784.
- Ferrer I, Aymami A, Rovira A, Grau Veciana JM. 1983. Growth of abnormal neurites in atypical Alzheimer's disease. A study with the Golgi method. *Acta Neuropathol* 59(3):167-170.
- Ferrer I, Guionnet N, Cruz-Sanchez F, Tunon T. 1990a. Neuronal alterations in patients with dementia: a Golgi study on biopsy samples. *Neurosci Lett* 114(1):11-16.
- Ferrer I, Gullotta F. 1990b. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol* 79(6):680-685.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39(1):29-54.
- Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, Jr., Scheltens P, Thompson PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6(2):67-77.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB. 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9(2):139-148.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373(6514):523-527.
- Garcia-Marin V, Blazquez-Llorca L, Rodriguez JR, Boluda S, Muntane G, Ferrer I, Defelipe J. 2009. Diminished perisomatic GABAergic terminals on cortical neurons adjacent to amyloid plaques. *Front Neuroanat* 3:28.
- Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M. 2007. Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12(2):161-174.

- Gelfo F, De Bartolo P, Giovine A, Petrosini L, Leggio MG. 2009. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 91 (4):353-365.
- Gerlai R, Fitch T, Bales KR, Gitter BD. 2002. Behavioral impairment of APP(V717F) mice in fear conditioning: is it only cognition? *Behav Brain Res* 136 (2):503-509.
- Gloor P. 1997. *The Temporal Lobe and Limbic System*. Oxford: Oxford University Press.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704-706.
- Golgi C. 1873. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana-Lombardia* 6 (33):244-246.
- Golgi C. 1877. Sulle alterazione degli organi centrali nervosa in un caso di corea gesticolatoria associate ad alienazione mentale. *Rivista Clinica*, 867-869.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(14):4491-4500.
- Gong Y, Meyer EM, Meyers CA, Klein RL, King MA, Hughes JA. 2006. Memory-related deficits following selective hippocampal expression of Swedish mutation amyloid precursor protein in the rat. *Exp Neurol* 200(2):371-377.
- Gordon U, Polsky A, Schiller J. 2006. Plasticity compartments in basal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 26(49):12717-12726.
- Graeber MBK, S. Egnesperger, R. Banati, R.B. Müller, U. Bise, K. Hoff, P. Möller, H.J. Fujisawa, K. Mehraein, P. . 1997. Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer en 1911: historial, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*. 1:73-80.
- Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183(4675):1592-1593.
- Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB. 2007. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1097:30-39.
- Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420(6917):812-816.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359(6393):322-325.
- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2):101-112.
- Haber M, Zhou L, Murai KK. 2006. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 26 (35):8881-8891.
- Hall E. 1972. The amygdala of the cat: a Golgi study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 134(4):439-458.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119(6):598-620.
- Hamann S, Monarch ES, Goldstein FC. 2002. Impaired fear conditioning in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 40(8):1187-1195.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15 (3):112-119.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256 (5054):184-185.
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y. 2003. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10966-10971.
- Harris KM, Stevens JK. 1988. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 8(12):4455-4469.
- Harris KM, Stevens JK. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9(8):2982-2997.
- Hausser M, Mel B. 2003. Dendrites: bug or feature? *Curr Opin Neurobiol* 13(3):372-383.
- Heffernan JM, Eastwood SL, Nagy Z, Sanders MW, McDonald B, Harrison PJ. 1998. Temporal cortex synaptophysin mRNA is reduced in Alzheimer's disease and is negatively correlated with the severity of dementia. *Exp Neurol* 150(2):235-239.
- Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ, et al. 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1(3):218-221.
- Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2 (12):880-888.
- Hernandez F, Lucas JJ, Cuadros R, Avila J. 2003. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging* 24(8):1087-1094.
- Herzog AG, Kemper TL. 1980. Amygdaloid changes

- in aging and dementia. *Arch Neurol* 37(10):625-629.
- Hoenicka J. 2006. [Genes in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 42(5):302-305.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH. 1990. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301(1):44-54.
- Hof PR, Morrison JH. 1990. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J Comp Neurol* 301(1):55-64.
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349(9046):151-154.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4(1):97-100.
- Holmes WR. 1989. The role of dendritic diameters in maximizing the effectiveness of synaptic inputs. *Brain Res* 478(1):127-137.
- Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P. 1992. Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13(3):375-382.
- Honig LS, Kukull W, Mayeux R. 2005. Atherosclerosis and AD: analysis of data from the US National Alzheimer's Coordinating Center. *Neurology* 64(3):494-500.
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68(6):1067-1081.
- Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. 1985. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* 234(1):17-34.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3228-3233.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274(5284):99-102.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. 2006. AMPAR removal underlies A $\beta$ -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52(5):831-843.
- Humeau Y, Herry C, Kemp N, Shaban H, Fourcaudot E, Bissiere S, Luthi A. 2005. Dendritic spine heterogeneity determines afferent-specific Hebbian plasticity in the amygdala. *Neuron* 45(1):119-131.
- Insausti R, Amaral DG. 2004. Hippocampal formation. En: Paxinos G, Mai, JK (eds). *The Human Nervous System*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. p 872-915.
- Insausti R, Tunon T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM. 1995. The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol* 355(2):171-198.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3):198-210.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. 2009. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118(1):53-69.
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. 1997. APPSw transgenic mice develop age-related A $\beta$  deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(9):965-973.
- Jack CR, Jr., Petersen RC, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Kokmen E. 1997. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 49(3):786-794.
- Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE. 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13):5161-5166.
- Ji ZS, Miranda RD, Newhouse YM, Weisgraber KH, Huang Y, Mahley RW. 2002. Apolipoprotein E4 potentiates amyloid  $\beta$  peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem* 277(24):21821-21828.
- Ji ZS, Mullendorff K, Cheng IH, Miranda RD, Huang Y, Mahley RW. 2006. Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid  $\beta$  peptide: lysosomal stability and neurodegeneration. *J Biol Chem* 281(5):2683-2692.
- Jones EG. 1984. Laminar distributions of cortical efferent cells. In: Peters A, Jones, E. G., editor. *Cerebral Cortex: Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum Press. p 521-552.
- Jucker M, Beyreuther K, Haass C, Nitsch R, Christen Y. 2006. *Alzheimer: 100 Years and Beyond*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alz-

- heimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325(6106):733-736.
- Kaplan PS, Hearst E. 1982. Bridging temporal gaps between CS and US in autoshaping: insertion of other stimuli before, during, and after CS. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 8(2):187-203.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33(3):121-129.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26(7):360-368.
- Katzman R. 1986. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 314(15):964-973.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A. 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23(2):138-144.
- Katzman RK, C. 1994. Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. En: Terry RD, Katzman R, Bick KL, editors. *Alzheimer Disease*. New York: Raven Press, 105-122.
- Kemper T. 1984. Neuroanatomical and neuropathological changes in normal aging and dementia. En: Albert M L (Ed). *Clinical Neurology of Aging*. New York, Oxford University Press. pp. 9-52.
- Kharazia VN, Weinberg RJ. 1999. Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *J Comp Neurol* 412(2):292-302.
- Kim M, Davis M. 1993. Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle even with extensive training but do not prevent reacquisition. *Behav Neurosci* 107(4):580-595.
- Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T. 1996. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 7(4):177-181.
- Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Feraud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J. 2009. Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19(3):586-592.
- Knafo S, Libersat F, Barkai E. 2005. Olfactory learning-induced morphological modifications in single dendritic spines of young rats. *Eur J Neurosci* 21(8):2217-2226.
- Knafo S, Venero C, Merino-Serrais P, Feraud-Espinosa I, Gonzalez-Soriano J, Ferrer I, Santpere G, DeFelipe J. 2009. Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pathol* 219(1):41-51.
- Kölliker Av. 1896. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, 6th ed, vol II. Nervensystem des Menschen und der Thiere. Engelmann, Leipzig.
- Koo JW, Han JS, Kim JJ. 2004. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J Neurosci* 24(35):7654-7662.
- Kuljis RO, Tikoo RK. 1997. Discontinuous distribution of senile plaques within striate cortex hypercolumns in Alzheimer's disease. *Vision Res* 37(24):3573-3591.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27(4):796-807.
- Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, Zakharenko SS. 2004. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47):16665-16670.
- Larkman AU. 1991. Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306(2):332-343.
- Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. 2002. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: projections to the neocortex. *J Comp Neurol* 447(4):394-420.
- Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. 2001. Subcortical efferent projections of the perirhinal and parahippocampal cortices in Macaque monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 27.
- Ledo-Varela MT, Gimenez-Amaya JM, Llamas A. 2007. [The amygdaloid complex and its implication in psychiatric disorders]. *An Sist Sanit Navar* 30(1):61-74.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL. 2003. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112(5):631-643.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269(5226):973-977.
- Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH. 1987. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci* 7(6):1799-1808.
- Li YJ, Hauser MA, Scott WK, Martin ER, Booze MW, Qin XJ, Walter JW, Nance MA, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Vance JM. 2004. Apolipoprotein

- tein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. *Neurology* 62(11):2005-2009.
- Lippa CF, Hamos JE, Pulaski-Salo D, DeGennaro LJ, Drachman DA. 1992. Alzheimer's disease and aging: effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiol Aging* 13(3):405-411.
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92(2):180-185.
- Lorente de Nó R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 45:381-442.
- Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J. 1996. Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(10):1083-1088.
- Lund JS. 1984. Spiny stellate neurons. In: Peters A, Jones, E.G., editor. *Cerebral cortex: Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum Press. p 255-308.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32(5):367-381.
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST. 2008. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283(14):9359-9368.
- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD. 2000. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):4398-4403.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. 2006. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):5644-5651.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ. 1996. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382(6589):363-366.
- Majewska A, Tashiro A, Yuste R. 2000. Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. *J Neurosci* 20(22):8262-8268.
- Majewska A, Yuste R. 2001. Topology of gap junction networks in *C. elegans*. *J Theor Biol* 212(2):155-167.
- Malm TM, Iivonen H, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Kanninen K, Salmiinen A, Auriola S, Van Groen T, Tanila H, Koistinaho J. 2007. Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in APP/PS1 mice without affecting beta-amyloid burden. *J Neurosci* 27(14):3712-3721.
- Mandybur TI. 1989. Cerebral amyloid angiopathy and astrocytic gliosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 78(3):329-331.
- Marin-Padilla M. 1972. Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res* 44(2):625-629.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Roth A, Sakmann B. 1997. Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J Physiol* 500 ( Pt 2):409-440.
- Masliah E, Crews L, Hansen L. 2006. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl):91-99.
- Masliah E, Ellisman M, Carragher B, Mallory M, Young S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD. 1992. Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51(4):404-414.
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM. 1994. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13(4):989-1002.
- Matsuo N, Reijmers L, Mayford M. 2008. Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science* 319(5866):1104-1107.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4(11):1086-1092.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429(6993):761-766.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000):631-639.
- Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7(4):278-294.
- Maurage CA, Sergeant N, Ruchoux MM, Hauw JJ, Delacourte A. 2003. Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathol* 105(2):89-97.
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:81-104.
- McDonald AJ. 1982. Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J Comp Neurol* 212(3):293-312.
- McDonald AJ. 1984. Neuronal organisation of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei of the rat. *Journal Comparative Neurology* 222:589-606.
- McDonald AJ. 1992. Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain research Bulletin* 28:179-185.
- McDonald AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55(3):257-332.



- McDonald AJ, Culberson JL. 1981. Neurons of the basolateral amygdala: a Golgi study in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Am J Anat* 162(4):327-342.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46(6):860-866.
- Merino-Serrais P, Knafo S, Alonso-Nanclares L, Fernandez-Espinoza I, Defelipe J. Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*.
- Meyer EM. 1896b. Ueber eine Verbindungsweise der Neurone. Nebst Mitteilungen über die Technik und die Erfolge der Methode der subcutanen Methylenblauinjection. *Arch. Mikrosk. Anat.* 47, 734-748.
- Meyer EM. 1897. Ueber die Funktion der Protoplasmafortsätze der Nervenzellen. Bericht. Math.-Phys. Cl. Königl. Sächs. Gesells. Wiss., Leipzig. 49, 475-495.
- Meyer S. 1896a. Die subcutane Methylenblauinjection, ein Mittel zur Darstellung der Elemente des Central nervensystems von Säugethieren.
- Millhouse OE, DeOlmos J. 1983. Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience* 10(4):1269-1300.
- Minkeviciene R, Ihalaenen J, Malm T, Matilainen O, Keksa-Goldsteine V, Goldsteins G, Iivonen H, Leguit N, Glennon J, Koistinaho J, Banerjee P, Tanila H. 2008. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* 105(3):584-594.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274 (10):6483-6492.
- Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F. 1996. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J* 15(6):1265-1274.
- Moller A, Strange P, Gundersen HJ. 1990. Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the disector. *J Microsc* 159(Pt 1):61-71.
- Monti A. 1895a. Sur l'anatomie pathologique des éléments nerveux dans les processus provenant d'émolisme cérébral.-Considérations sur la signification physiologique des prolongements protoplasmiques des cellules nerveuses. *Arch. ital. Biol.* 24, 20-33.
- Monti A. 1895b. Sur les altérations du système nerveux dans l' inanition. *Arch. ital. Biol.* 24, 347-360.
- Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. 2004. Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* 33(3):377-387.
- Mori E, Ikeda M, Hirono N, Kitagaki H, Imamura T, Shimomura T. 1999. Amygdalar volume and emotional memory in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 156(2):216-222.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y. 2002. Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70(3):392-401.
- Morrison JH, Hof PR. 2007. Life and death of neurons in the aging cerebral cortex. *Int Rev Neurobiol* 81:41-57.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1(5):345-347.
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF. 2000. Dynamics of dendritic calcium transients evoked by quantal release at excitatory hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):901-906.
- Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, Momoli F, Welner SA, Massicotte G, Julien JP, Shapiro ML. 1997. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387(6632):500-505.
- Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, et al. 1994. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18):8378-8382.
- Nimchinsky EA, Yasuda R, Oertner TG, Svoboda K. 2004. The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. *J Neurosci* 24(8):2054-2064.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21 (3):545-559.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003b. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24(8):1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003a. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39(3):409-421.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35 (3):535-545.

- Pare D, Smith Y, Pare JF. 1995. Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience* 69(2):567-583.
- Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP. 1985. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(13):4531-4534.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127(4):321-355.
- Peters A, Palay SL, Webster H. 1991. *The Fine Structure of the Nervous System*. New York: Oxford University Press.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106(2):274-285.
- Phinney AL, Deller T, Stalder M, Calhoun ME, Frotscher M, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. 1999. Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 19(19):8552-8559.
- Poirazi P, Mel BW. 2001. Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron* 29(3):779-796.
- Poirier J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17(12):525-530.
- Popov VB, LS. 1992. Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibre and hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience* 48:53-62.
- Prather MD, Lavenex P, Mauldin-Jourdain ML, Mason WA, Capitanio JP, Mendoza SP, Amaral DG. 2001. Increased social fear and decreased fear of objects in monkeys with neonatal amygdala lesions. *Neuroscience* 106(4):653-658.
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. 1991. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 12(4):295-312.
- Price JL, Morris JC. 2004. So what if tangles precede plaques? *Neurobiol Aging* 25(6):721-723; discussion 743-726.
- Priller C, Dewachter I, Vassallo N, Paluch S, Pace C, Kretschmar HA, Van Leuven F, Herms J. 2007. Mutant presenilin 1 alters synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 282(2):1119-1127.
- Probst A, Basler V, Bron B, Ulrich J. 1983. Neuritic plaques in senile dementia of Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res* 268(2):249-254.
- Purpura DP. 1974. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* 186(4169):1126-1128.
- Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA. 1998. Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J Comp Neurol* 391(3):335-352.
- Rafalowska J, Barcikowska M, Wen GY, Wisniewski HM. 1988. Laminar distribution of neuritic plaques in normal aging, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Acta Neuropathol* 77(1):21-25.
- Rainnie DG, Asprodini EK, Shinnick-Gallagher P. 1993. Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 69(4):1350-1362.
- Rakic P. 2002. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22(3):614-618.
- Reiman EM, Caselli RJ. 1999. Alzheimer's disease. *Maturitas* 31(3):185-200.
- Rescorla RA. 1972. "Configural" conditioning in discrete-trial bar pressing. *J Comp Physiol Psychol* 79(2):307-317.
- Retzius G. 1891. Ueber den Bau der Oberflächenschicht der Grosshirnrinde beim Menschen und bei den Säugethieren. *Biologiska Föreningens Förhandlingar*. 3:90-102.
- Reynolds IJ, Rintoul GL. 2004. Mitochondrial stop and go: signals that regulate organelle movement. *Sci STKE* 2004(251):PE46.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. 2003. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61(1):1-24.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44(1):75-91.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376(6543):775-778.
- Rogers J, Morrison JH. 1985. Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 5(10):2801-2808.
- Rose M. 1927. Allocortex bei Tier und Mensch. Die sogenannte Riechrinde beim Menschen und beim Affen. *J Psychol. Neurol.* 34:261-401.
- Rosenberg RN. 2000. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* 54(11):2045-2054.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83(3):803-834.
- Saha RN, Liu X, Pahan K. 2006. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune*

- Pharmacol 1(3):212-222.
- Saint-Cyr JA, Ungerleider LG, Desimone R. 1990. Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* 298 (2):129-156.
- Samuel W, Alford M, Hofstetter CR, Hansen L. 1997. Dementia with Lewy bodies versus pure Alzheimer disease: differences in cognition, neuropathology, cholinergic dysfunction, and synapse density. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(5):499-508.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309(5733):476-481.
- Schafe GE, Doyere V, LeDoux JE. 2005. Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25 (43):10010-10014.
- Schaffer K. 1892. Beitrag zur Histologie der Ammonshornformation, *Arch. mikrosk. Anat.*, 39, 611-632.
- Scharfman HE, Witter MP, Schwarcz R. 2000. The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 911:ix-xiii.
- Scheibel AB, Tomiyasu U. 1978. Dendritic sprouting in Alzheimer's presenile dementia. *Exp Neurol* 60 (1):1-8.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind W, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2(8):864-870.
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17(15):5858-5867.
- Schikorski T, Stevens CF. 2001. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci* 4(4):391-395.
- Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F. 2000. Vascular risk factors in dementia. *J Neurol* 247(2):81-87.
- Scott SA, DeKosky ST, Scheff SW. 1991. Volumetric atrophy of the amygdala in Alzheimer's disease: quantitative serial reconstruction. *Neurology* 41 (3):351-356.
- Selkoe DJ. 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8(11):447-453.
- Selkoe DJ. 2001a. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81(2):741-766.
- Selkoe DJ. 2001b. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32(2):177-180.
- Selkoe DJ. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594):789-791.
- Seress L, Mrzljak L. 1987. Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res* 405(1):169-174.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14(8):837-842.
- Sims KS, Williams RS. 1990. The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience* 36(2):449-472.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH. 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3(4):281-290.
- Smith KD, Kallhoff V, Zheng H, Pautler RG. 2007. In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 35 (4):1401-1408.
- Smith Y, Pare D. 1994. Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 342(2):232-248.
- Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. 1997. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *JAMA* 277(10):813-817.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8):1051-1058.
- Spacek J, Hartmann M. 1983. Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices. *Anat Embryol (Berl)* 167(2):289-310.
- Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, Bacskai BJ, Hyman BT. 2005. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25(31):7278-7287.
- Spires-Jones TL, de Calignon A, Matsui T, Zehr C, Pitstick R, Wu HY, Osetek JD, Jones PB, Bacskai BJ, Feany MB, Carlson GA, Ashe KH, Lewis J, Hyman BT. 2008. In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons. *J Neurosci* 28(4):862-867.
- Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD,

- Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT. 2007. Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol* 171(4):1304-1311.
- Spruston N. 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9(3):206-221.
- Squire LR, Zola-Morgan S. 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253(5026):1380-1386.
- Spronsen VM, Hoogenraad CC. Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10(3):207-214.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156(6):1051-1063.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5):1977-1981.
- Suzuki WA, Amaral DG. 1994. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* 350(4):497-533.
- Suzuki WA, Amaral DG. 2003. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cytoarchitectonic and chemoarchitectonic organization. *J Comp Neurol* 463(1):67-91.
- Sweatt JD. 2004. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology (Berl)* 174(1):99-110.
- Terry RD. 2000. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(12):1118-1119.
- Terry RD, Katzman R. 1983. Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 14(5):497-506.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30(4):572-580.
- Terwel D, Dewachter I, Van Leuven F. 2002. Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2(2):151-165.
- Thal DR, Holzer M, Rub U, Waldmann G, Gunzel S, Zedlick D, Schober R. 2000. Alzheimer-related tau-pathology in the perforant path target zone and in the hippocampal stratum oriens and radiatum correlates with onset and degree of dementia. *Exp Neurol* 163(1):98-110.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. 2007. Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282(46):33305-33312.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420(6917):788-794.
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O. 2004. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55(6):801-814.
- Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB. 2004. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7(11):1181-1183.
- Van Gassen G, Annaert W. 2003. Amyloid, prenilins, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 9(2):117-126.
- Van Hoesen GW. 1981. In *The amygdaloid complex* (Ben-Ari, Y. ed), pp. 77-90. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Van Hoesen GW. 1982. New observations regarding its cortical connections in the monkey. *Trends Neurosci* 5, 345-350.
- Van Hoesen GW. 1995. Anatomy of the temporal medial lobe. *Mag Res Imag* 13:1047-1055.
- Vereecken TH, Vogels OJ, Nieuwenhuys R. 1994. Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15(1):45-54.
- Vetter P, Roth A, Hausser M. 2001. Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol* 85(2):926-937.
- von Economo C. 1929. *The cytoarchitectonics of the human cerebral cortex*. London: Oxford University Press.
- Wakabayashi K, Honer WG, Masliah E. 1994. Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain Res* 667(1):24-32.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880):535-539.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101(5):1172-1184.
- Washburn MS, Moises HC. 1992. Electrophysiological and morphological properties of rat basolateral amygdaloid neurons in vitro. *J Neurosci* 12(10):4066-4079.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344(8925):769-772.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. 2002. The relationship between A $\beta$  and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(5):1858-1867.
- White EL. 1989. *Cortical Circuits. Synaptic organization of the cerebral cortex. Structure, function and theory*. Boston: Birkhäuser.
- Wimo A, Jonsson L, Winblad B. 2006. An estimate of

- the worldwide prevalence and direct costs of dementia in 2003. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21(3):175-181.
- Wisniewski HM, Terry RD. 1973. Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog Brain Res* 40(0):167-186.
- Witcher MR, Kirov SA, Harris KM. 2007. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55(1):13-23.
- Yamaguchi H, Hirai S, Shoji M, Harigaya Y, Okamoto Y, Nakazato Y. 1989. Alzheimer type dementia: diffuse type of senile plaques demonstrated by beta protein immunostaining. *Prog Clin Biol Res* 317:467-474.
- Ye S, Huang Y, Mullendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW. 2005. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18700-18705.
- Yen SH, Horoupian DS, Terry RD. 1983. Immunocytochemical comparison of neurofibrillary tangles in senile dementia of Alzheimer type, progressive supranuclear palsy, and postencephalitic parkinsonism. *Ann Neurol* 13(2):172-175.
- Yip AG, McKee AC, Green RC, Wells J, Young H, Cupples LA, Farrer LA. 2005. APOE, vascular pathology, and the AD brain. *Neurology* 65(2):259-265.
- Yuste R. 2010. *Dendritic Spines*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Yuste R, Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5(1):24-34.
- Yuste R, Majewska A. 2001. On the function of dendritic spines. *Neuroscientist* 7(5):387-395.
- Yuste R, Majewska A, Holthoff K. 2000. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3(7):653-659.

## **VIII. ANEXO**





- 1. Widespread Changes in Dendritic Spines in a Model of Alzheimer's Disease.**  
**Cerebral Cortex (2008) 19:586 - 592.**



## Widespread Changes in Dendritic Spines in a Model of Alzheimer's Disease

S. Knafo<sup>1</sup>, L. Alonso-Nanclares<sup>1</sup>, J. Gonzalez-Soriano<sup>2</sup>, P. Merino-Serrais<sup>1</sup>, I. Feraud-Espinosa<sup>1</sup>, I. Ferrer<sup>3</sup> and J. DeFelipe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal (CSIC), 28002 Madrid, Spain, <sup>2</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain and <sup>3</sup>Institut Neuropatologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

**The mechanism by which dementia occurs in patients with Alzheimer's disease (AD) is not known. We assessed changes in hippocampal dendritic spines of APP/PS1 transgenic mice that accumulate amyloid beta throughout the brain. Three-dimensional analysis of 21 507 dendritic spines in the dentate gyrus, a region crucial for learning and memory, revealed a substantial decrease in the frequency of large spines in plaque-free regions of APP/PS1 mice. Plaque-related dendrites also show striking alterations in spine density and morphology. However, plaques occupy only 3.9% of the molecular layer volume. Because large spines are considered to be the physical traces of long-term memory, widespread decrease in the frequency of large spines likely contributes to the cognitive impairments observed in this AD model.**

**Keywords:** Alzheimer's disease, confocal microscopy, dementia, dentate gyrus, transgenic mice

### Introduction

One of the primary pathological characteristics of Alzheimer's disease (AD) is the presence of amyloid plaques, formed by aggregated  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptides. In mice, the expression of chimeric mouse/human amyloid precursor protein (Mo/HuAPP695swe) and a mutant human presenilin 1 (PS1-dE9), proteins that are both involved in familial forms of AD, lead to an early amyloid pathology. These double transgenic mice (APP/PS1) are often used as an animal model of AD, although they do not develop the extensive neuronal loss or neurofibrillary changes typical in AD (Irizarry et al. 1997). Nevertheless, this mouse model is used to investigate the effect of  $A\beta$  overproduction and deposition on brain circuitry.

Although  $A\beta$  plaques have been associated with changes in neurite morphology and dendritic spine density (Tsai et al. 2004; Spires et al. 2005), there is a poor correlation between plaque load and cognitive functions (Terry et al. 1991), raising doubts as to whether the accumulation of  $A\beta$  plaques in the brain induces AD. Nevertheless, morphological studies on AD models and patients have so far focused on the structural changes occurring within or proximal to plaques (Tsai et al. 2004; Spires et al. 2005).

Dendritic spines represent the major postsynaptic elements of excitatory synapses in the cerebral cortex (Gray 1959) and are fundamental to memory, learning and cognition (Lamprecht and LeDoux 2004). Dendritic spines undergo remarkable activity-dependent structural changes (Lang et al. 2004; Tsai et al. 2004). The spine head size influences spine motility and stability. Spine head size determines the probability that a spine bears a synapse (Arellano et al. 2007). Furthermore, there is a strong correlation between spine head size and the strength

of the axo-spinous synapse (Zuo et al. 2005). Importantly, recent evidence indicates that spine heads are targets of oligomeric  $A\beta$  (Lacor et al. 2007). Therefore, spine head morphology may link  $A\beta$  pathology and synaptic dysfunction.

We individually injected granular neurons in the dentate gyrus with a fluorescent dye and counterstained  $A\beta$  plaques with thioflavin-s. We measured the head volume and neck length in 3 dimensions of thousands of individual dendritic spines that have been scanned by confocal microscopy. Our results show that plaques substantially affect dendrites and spines. Importantly, we also determined that plaque-free regions of APP/PS1 mice are affected. These regions are very deficient in large spines, although spine density is conserved. We suggest that widespread decreased frequency of large spines contributes to the cognitive deficits found in this AD model.

### Materials and Methods

#### Mice

The mouse line used in this study ( $N = 9$ , age 12–14 months) expressed a Mo/Hu APP695swe construct in conjunction with the exon-9-deleted variant of human presenilin 1 (PS1-dE9) (Scheuner et al. 1996). Age-matched littermates served as controls ( $N = 9$ ). The experiments were approved by the ethical institutional committee according to National Institutes of Health guidelines.

#### Intracellular Injections

The preparation of brains for intracellular injections is detailed in the supplemental methods. A total of 235 granular neurons from Tg- mice and 462 neurons from APP/PS1 mice were microinjected individually with Alexa594 (Invitrogen, Eugene, OR, Fig. 1*a,b*). After injection, plaques were counterstained with thioflavin-s. Image acquisition and processing are described in the supplemental information. All morphological measurements were performed on stacks that did not contain images of plaques (see supplemental information).

#### Spine Morphology

Imaris 5.0 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) was used to measure spine head volume and neck length. A solid surface that exactly matched the contours of the head was constructed for each spine (Isosurface module, Fig. 1*j-m*, Supplemental Fig. 1*b,c*). For details, see supplemental methods.

#### Unbiased Stereology

The number of labeled plaques was estimated by optical fractionator. The volume of plaques was estimated with the Nucleator probe (Moller et al. 1990), as described in the supplemental methods.

#### Statistics

For all measured morphological parameters, values were averaged to give a cell mean. Neurons from each animal were averaged for an animal mean. Normality was tested using the Kolmogorov-Smirnov test.

**2. Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic Mouse model of Alzheimer's disease.**  
**Journal of Pathology (2009) 219(1):41-51.**



Original Paper

## Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Shira Knafo,<sup>1\*</sup> Cesar Venero,<sup>2†</sup> Paula Merino-Serrais,<sup>1</sup> Isabel Fernaud-Espinosa,<sup>1</sup> Juncal Gonzalez-Soriano,<sup>3</sup> Isidro Ferrer,<sup>4</sup> Gabriel Santpere<sup>4</sup> and Javier DeFelipe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal (CSIC), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Psychobiology, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Institut Neuropatologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

\*Correspondence to:

Shira Knafo or Javier DeFelipe,  
Instituto Cajal (CSIC),  
Madrid, Spain.

E-mail: defelipe@icajal.csic.es;  
sknafo@cbm.uam.es

†These authors contributed  
equally to this work.

The authors have no conflicts of  
interest to disclose.

### Abstract

Patients with Alzheimer's disease (AD) suffer from impaired memory and emotional disturbances, the pathogenesis of which is not entirely clear. In APP/PS1 transgenic mice, a model of AD in which amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) accumulates in the brain, we have examined neurons in the lateral nucleus of the amygdala (LA), a brain region crucial to establish cued fear conditioning. We found that although there was no neuronal loss in this region and  $A\beta$  plaques only occupy less than 1% of its volume, these mice froze for shorter times after auditory fear conditioning when compared to their non-transgenic littermates. We performed a three-dimensional analysis of projection neurons and of thousands of dendritic spines in the LA. We found changes in dendritic tree morphology and a substantial decrease in the frequency of large spines in plaque-free neurons of APP/PS1 mice. We suggest that these morphological changes in the neurons of the LA may contribute to the impaired auditory fear conditioning seen in this AD model.

Copyright © 2009 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** Alzheimer's disease; unbiased stereology; morphology; confocal microscopy; APP; PS1; amyloid; plaques; cognition; dementia; learning; dendritic spines

Received: 8 January 2009  
Revised: 25 March 2009  
Accepted: 27 March 2009

### Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that causes dementia and emotional disturbances [1]. AD is neuropathologically characterized by the accumulation of extracellular fibrillar amyloid beta peptide ( $A\beta$ ) in amyloid plaques (plaques) and of intraneuronal neurofibrillary tangles consisting of aggregated hyperphosphorylated tau, and by elevated brain levels of soluble  $A\beta$  oligomers. Plaques and neurofibrillary tangles are distributed in the hippocampus, neocortex, and in subcortical regions such as the amygdala, nucleus basalis, thalamus, locus coeruleus, and raphe nuclei [2]. The amygdala plays a major role in the processing and memorizing of emotional reactions [3]. The amygdala of AD patients undergoes significant shrinkage, distortion, and loss of neurons, as well as extensive gliosis [4,5]. Moreover, the extent of amygdaloid atrophy correlates positively with the degree of emotional memory impairment [6]. The different nuclei of the amygdala have unique connections and they fulfil specific functions.

For example, the lateral nucleus of the amygdala (LA) is a key site of plasticity that underlies fear learning [7,8]. The LA receives sensory input from the thalamus and cerebral cortex, and it generates emotional responses by activating different subcortical regions [9]. The outputs of the LA arise from projection neurons [10], which were the subject of this study.

In mice, the expression of proteins that are implicated in familial AD — a chimeric mouse/human amyloid precursor protein (Mo/HuAPP695swe) and a mutant human presenilin 1 (PS1-dE9) — leads to the early appearance of amyloid plaques [11]. We used these double transgenic (APP/PS1) mice to investigate the effects of  $A\beta$  overproduction and deposition on auditory fear conditioning, and to examine whether  $A\beta$  deposition provokes neuronal loss and changes in the morphology of projection neurons in the LA. Previous studies performed in transgenic mice carrying a single APP transgene, or different combinations of the APP and PS1 transgenes, reported contrasting results after training in the auditory cued

**3. Layer-Specific Alterations to CA1 Dendritic Spines in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Hippocampus* (2010), (Epub ahead of print).**





## RAPID COMMUNICATION

## Layer-Specific Alterations to CA1 Dendritic Spines in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

P. Merino-Serrais,<sup>1</sup> S. Knafo,<sup>1,2\*</sup> L. Alonso-Nanclares,<sup>1</sup> I. Feraud-Espinosa,<sup>1</sup> and J. DeFelipe<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Why memory is a particular target for the pathological changes in Alzheimer's Disease (AD) has long been a fundamental question when considering the mechanisms underlying this disease. It has been established from numerous biochemical and morphological studies that AD is, at least initially, a consequence of synaptic malfunction provoked by Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptide. APP/PS1 transgenic mice accumulate A $\beta$  throughout the brain, and they have therefore been employed to investigate the effects of A $\beta$  overproduction on brain circuitry and cognition. Previous studies show that A $\beta$  overproduction affects spine morphology in the hippocampus and amygdala, both within and outside plaques (Knafo et al., (2009) *Cereb Cortex* 19:586–592; Knafo et al., (in press) *J Pathol*). Hence, we conducted a detailed analysis of dendritic spines located in the *stratum oriens* and *stratum radiatum* of the CA1 hippocampal subfield of APP/PS1 mice. Three-dimensional analysis of 18,313 individual dendritic spines revealed a substantial layer-specific decrease in spine neck length and an increase in the frequency of spines with a small head volume. Since dendritic spines bear most of the excitatory synapses in the brain, changes in spine morphology may be one of the factors contributing to the cognitive impairments observed in this AD model. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** morphology; confocal microscopy; amyloid beta; unbiased stereology; amyloid precursor protein

## INTRODUCTION

The presence of A $\beta$  plaques is one of the pathological hallmarks of AD, and they have been associated with changes in neurite morphology and dendritic spine density (Tsai et al., 2004; Spire et al., 2005; Knafo

et al., 2009a, in press). Apart from amyloid plaques, the A $\beta$  peptide accumulates in different forms in AD: intracellular A $\beta$  and oligomeric A $\beta$ . Indeed, it has been demonstrated that spine heads are targets of oligomeric A $\beta$  (Lacor et al., 2007), and it has been suggested that targeting and functional disruption of particular synapses by A $\beta$  oligomers may provide a molecular basis for the specific memory loss in AD (Lacor et al., 2007). Nevertheless, previous studies indicate that there is only a weak correlation between plaque load and cognitive functions (Terry et al., 1991). In fact, plaques are sometimes detected even in nondemented patients (Price et al., 2009) and cognitive decline is better reflected by the level of soluble A $\beta$  oligomers, distributed diffusely outside the plaques (Selkoe, 2002). Moreover, at least in aged mice bearing AD mutations, plaques occupy a negligible fraction of the neuropil, less than 5% (Cohen et al., 2009; Knafo et al., 2009a, in press), and therefore, it is unlikely that cognitive impairment in these mice arises solely from changes in synapses within the plaques. Hence, AD neuropathological research is increasingly focusing on the changes in plaque-free regions of the neuropil and in AD-like pathology prior to plaque appearance. Here we have analyzed dendritic spines in the CA1 subfield, an area critical for spatial orientation and learning (Andersen et al., 2006), in order to determine the microstructural basis of the hippocampal-dependent cognitive impairment in APP/PS1 mice (Malm et al., 2007). Dendritic spines represent the major postsynaptic elements of excitatory synapses in the cerebral cortex (Gray, 1959) and they are fundamental to memory, learning and cognition (Lamprecht and LeDoux, 2004). Dendritic spines undergo remarkable activity-dependent structural changes (Lang et al., 2004; Tsai et al., 2004) and they are targets of oligomeric A $\beta$  (Lacor et al., 2007). Therefore, spine morphology may be associated with A $\beta$  pathology and synaptic malfunction. We show that in APP/PS1 mice, CA1 spines necks are significantly shorter in the *stratum oriens*. In addition, the frequency of spines with a small head augments in the same *stratum radiatum* of the same subfield. These findings indicate that circuits in the *stratum radiatum* and the *stratum oriens* might be affected differently by AD-related mutations. In addition, this study suggests

<sup>1</sup> Instituto Cajal (CSIC), Madrid, Spain and Laboratorio de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain; <sup>2</sup> Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

P. Merino-Serrais and S. Knafo contributed equally to this work.

Grant sponsor: CIBERNED; Grant number: CB06/05/0,066; Grant sponsor: EU 6th Framework Program; Grant number: PROMEMORIA LSHM-CT-2,005–512012; Grant sponsor: Spanish Ministerio de Educación Ciencia e Innovación; Grant numbers: BFU2006–13395, SAF2009–09394, BES-2,007–16542; Grant sponsors: Fundación CIEN (Financiación de Proyectos de Investigación de Enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas 2008), Ministry of Science and Technology.

\*Correspondence to: Dr S. Knafo, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. E-mail: sknafo@cbm.uam.es

Accepted for publication 25 June 2010

DOI 10.1002/hipo.20861

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).